UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1963 N° 211

Contribution à l'Étude des Matières Organiques du Sol

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1963

PAR

GÉRARD GUI

Pharmacien

Diplômé de Toxicologie et Hygiène Industrielle,
de Sérologie et de Bromatologie.

Membres du Jury

MM.	P BOURBON	Président
	G. ROUX	
	J. BREUILLAUD	Assesseurs
	G. PITET	
	J. CARLES	Suppléant
	G. BROUSSY	

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE DE MEDECINE & DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN : Monsieur LAZORTHES
1er Assesseur : M. BLANC
2ème Assesseur : M. SOREL

DOYENS HONORAIRES : Messieurs GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

PROFESSEURS HONORAIRES : Messieurs RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BOUNHOURE.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MERIEL
Clinique médicale	GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique	FABRE Pierre
Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et path. interne	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL
Clinique médicale de la 1ère Enfance	BARDIER
Clinique neurologique et psychiatrique	GERAUD
Clinique obstétricale	GUILHEM Paul
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Clinique ORL et chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique rhumatologique	RUFFIE René
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale	PONTONNIER
Anatomie	LAZORTHES
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie Pathologique	FABRE Jacques
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY Jean
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES
Médecine sociale	N
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Physico-chimie	AUVERGNAT
Physiologie	LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacologie	BAISSET

Physique biologique et médicale	BUGNARD
Propédeutique médicale	LAPORTE Jacques
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	COULOUMA
Bactériologie	Mme ENJALBERT
Biochimie médicale	DOUSTE-BLAZY
Médecine Générale	MONNIER
Oto-Rhino-Laryngologie	CLAUX
Pathologie médicale	BOULARD
Pathologie chirurgicale	LAGROT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Histologie et Embryologie	PLANEL
Ophtalmologie	DEODATI
Parasitologie	RUFFIE Jacques
Physiologie	MONTASTRUC
Physique médicale	BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	BASTIDE
Anatomie Pathologique	BOUISSOU
Anesthésiologie	LARENG
Carcinologie	ESTRADE
Chirurgie générale	GEDEON
Electroradiologie	PONS
Hématologie	DUCOS
Histologie et embryologie	GUILHEM André
Pathologie expérimentale	GLEIZES
Physiologie	BESSOU
Physique médicale	COMMANAY
Pneumo-phtisiologie	MIGUERES

AGREGES

Médecine générale	RIBAUT
d°	CALAZEL
d°	RASCOL
d°	LE TALLEC
d°	RIBET
Chirurgie générale	ENJALBERT
d°	FICAT
d°	PASQUIE
d°	SOUQUET
d°	SARRAZIN
d°	GAUBERT
Dermatologie et syphiligraphie	DUPRE
Hydrologie	DENARD
Médecine légale	GREZES-RUEFF
Neurochirurgie	ESPAGNO Jacques
Neurologie et psychiatrie	GAYRAL
Obstétrique	ESPAGNO Guy
Ophtalmologie	BEC
Pneumo-phtisiologie	DELAUDE

AGREGES LIBRES

Anatomie	THOMAS
Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	BOURBON
Chimie pharmaceutique	BLANC
Matière médicale	VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	CAUJOLLE
Pharmacie galénique	STANISLAS
Zoologie	ROUX

PROFESSEUFS A TITRE PERSONNEL

Botanique	ROQUES
Pharmacie	COUTURIER
Sciences Naturelles	Mme CAUJOLLE

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie	BREUILLAUD
Sciences Physiques	PITET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Toxicologie	BROUSSY Georges

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	ROCHE
Secrétaire	BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats. (Délibération en date du 12 Mai 1891).

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0027

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1963 N° 211

Contribution à l'Étude des Matières Organiques du Sol

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1963

PAR

GÉRARD GUI

Pharmacien

Diplômé de Toxicologie et Hygiène Industrielle,
de Sérologie et de Bromatologie.

Membres du Jury	MM. P BOURBON	Président	
	G. ROUX		
	J. BREUILLAUD	Assesseurs	
	G. PITET		
	J. CARLES		
	G. BROUSSY	Suppléant	

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Contribution à l'Étude des Matières Organiques du Sol

A MES PARENTS,

témoignage de mon affection et
de ma reconnaissance infinies.

A MA FEMME, A MA FILLE,

en gage de mon immense amour.

A MA SOEUR,

pour son dévouement et sa ten-
dresse

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur P. BOURBON
Professeur de chimie, toxicologie
et hygiène industrielle.

Nous lui exprimons toute notre déférente reconnaissance pour l'intérêt vigilant dont il n'a cessé de nous entourer et pour la sollicitude qu'il nous a toujours témoignée. Pendant les deux années où nous avons fréquenté son laboratoire, il nous a toujours accueilli avec affabilité et nous a guidé par ses conseils et encouragements.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre sincère et fidèle attachement.

A NOTRE JURY DE THESE :

Monsieur le Professeur G. ROUX
Professeur de Zoologie

Qu'il veuille bien nous permettre de lui exprimer notre respectueuse reconnaissance pour l'aimable sollicitude avec laquelle il nous a accueilli, et nos remerciements déférents pour avoir bien voulu siéger à notre jury de thèse.

Monsieur le Professeur J. BREUILLAUD
Professeur sans chaire à la Faculté

Avec notre sincère reconnaissance pour l'intérêt bienveillant qu'il a voulu porter à notre travail.

Monsieur le Professeur G. PITET
Professeur sans chaire à la Faculté

Nous tenons à lui adresser nos vifs remerciements pour avoir bien voulu accepter de juger notre travail.

Monsieur le Professeur G. BROUSSY
Maître de conférences agrégé à la Faculté.

Qu'il nous soit permis de le remercier respectueusement.

A NOS MAITRES :

R.P. CARLES (s.j)

Directeur de Recherches au C.N.R.S.

Ayant eu le grand honneur d'être reçu dans son laboratoire, nous avons pu largement bénéficier de sa haute compétence toujours empreinte d'une délicate cordialité

En souvenir des précieuses acquisitions que nous n'avons cessé de faire sous sa direction, nous lui dédions ce travail et l'assurons de notre profonde reconnaissance et de notre vive admiration.

R.P. MAGNY (s.j)

Professeur à l'Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan

Il nous a toujours prodigué ses conseils et ses directives avec la simplicité et la compréhension que tout le monde admire en lui, nous sommes heureux de lui redire notre profonde gratitude.

Monsieur Armand LATTES

Maître-Assistant à la Faculté des Sciences

A mon grand et Cher Ami, Armand LATTES, dont les précieux conseils et les enseignements ont sans cesse guidé et soutenu mes efforts, je dédie ce modeste travail.

Je lui exprime mon infinie gratitude et je le prie de trouver ici l'expression de mon attachement.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE
DE PARIS

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

A MON MAITRE DE STAGE : Monsieur VINAY

AUX ELEVES DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE
de l'Institut Catholique de Toulouse et du
laboratoire de Chimie de l'Ecole Supérieure
d'Agriculture de Purpan.

A Monsieur P. PUIG,
Assistant au laboratoire de Chimie
et Toxicologie de la Faculté Mixte
de Médecine et Pharmacie

en les remerciant de l'aide dévouée qu'ils nous ont toujours prodiguée.

INTRODUCTION

La composition chimique de la matière organique des sols pose un problème fort complexe qui offre aux chercheurs un champ d'investigation des plus étendus. Malgré l'identification de nombreux composés ou leur classification sous diverses dénominations et caractéristiques, nos connaissances en ce domaine sont encore limitées. Peu de travaux avaient été entrepris jusqu'à ces dernières années du fait même de la complexité de la question en face des moyens restreints dont disposaient les laboratoires. Les découvertes techniques de ces vingt dernières années, le développement de l'électrophorèse de la spectrophotométrie, de la chromatographie, sont à la base des progrès accomplis durant cette période.

L'origine même de la matière organique des sols laisse présumer de sa complexité : débris végétaux, animaux, microorganismes, et surtout ces composés colorés de constitution inconnue, de poids moléculaires variables : les substances humiques. Tout cet ensemble subissant des transformations continues telles, que dans les conditions normales, il n'y a pas accumulation d'une substance quelconque : pendant que l'une se décompose, une autre se synthétise.

Prenant place dans la formation des sols, après la désagrégation de la matière minérale mère, l'incorporation et la transformation de la matière organique - l'humification - sont compliquées toujours par l'interaction et le déplacement des constituants minéraux et organiques. Sur ce milieu fluide et complexe, des difficultés premières: échantillonnage, extraction, séparation, peuvent être pressenties. D'autres viennent se rajouter tout au long de l'analyse et l'utilisation des résultats, obligatoirement partiels, en vue de la reconstitution de la structure d'ensemble, en est un des aspects les plus démonstratifs.

Notre contribution à l'étude de ces problèmes sera tout d'abord la mise au point d'une nouvelle méthode d'extraction des matières organiques, méthode que nous chercherons à rendre la plus efficace possible. Pour une terre déterminée, nous comparerons ensuite, du point de vue quantitatif, les valeurs extractives totales de notre procédé et celles du procédé à l'oxalate d'ammonium, méthode classique d'analyse. Au point de vue qualitatif, pour réaliser cette comparaison, nous essaierons d'imaginer un processus analytique permettant la séparation et la détermination de quelques constituants simples de matières plus complexes. A l'aide des résultats obtenus nous nous efforcerons ensuite de dégager quelques hypothèses quant à la structure organique des sols.

Notre exposé sera présenté selon le plan d'ensemble ci-après :

PLAN

AVANT-PROPOS : Echantillonnage

Ie PARTIE : MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE DES SOLS.

Chapitre 1 - Aperçu des connaissances actuelles sur la structure organique des sols.

Chapitre 2 - Méthodes d'extraction

- 1 - Méthode Chaminade
- 2 - Principe de la méthode au carbonate d'ammonium
- 3 - Technique de la méthode au carbonate d'ammonium
- 4 - Principe et technique des reprises ammoniacales
- 5 - Reprises au carbonate et à l'oxalate
- 6 - Remarques et conclusions

Chapitre 3 - Hypothèses émises sur le mécanisme d'extraction de la matière organique.

IIe PARTIE : ETUDE DE LA STRUCTURE D'ENSEMBLE DE LA MATIERE ORGANIQUE

Chapitre 1 - Etude spectrophotométrique U.V.
Chapitre 2 - Comportement électrophorétique
Chapitre 3 - Chromatographie directe
Chapitre 4 - Interprétation des résultats.

IIIe PARTIE : EXAMEN COMPARATIF DE LA STRUCTURE DETAILLEE DES DIFFERENTS EXTRAITS ORGANIQUES

Chapitre 1 - Exposé des méthodes utilisées.

1) - Méthodes préparatives

1 - Opérations préliminaires
2 - Utilisation directe des résines
3 - Utilisation des résines après hydrolyse acide des extraits
4 - Comparaison des deux méthodes

2) - Méthodes analytiques.

Chapitre 2 - Résultats expérimentaux
Chapitre 3 - Interprétation des résultats
Chapitre 4 - Conclusions de la troisième partie

IVe PARTIE : CONCLUSIONS GENERALES

AVANT - PROPOS

ECHANTILLONNAGE

Avant d'aborder l'exposé que nous avons entrepris, il est essentiel, comme nous l'avons fait remarquer implicitement dans notre introduction, de définir et de caractériser au mieux les échantillons que nous avons utilisés.

Tout au long de notre exposé, et lorsqu'il ne sera pas fait mention d'autres échantillonnages, il est entendu que nous avons utilisé dans notre travail, soit une terre limono-sableuse de Taron (échantillon I) dans les Basses-Pyrénées, soit une terre sableuse des Landes (échantillon II) ayant les caractéristiques ci-dessous.

RESULTATS ANALYTIQUES

	ECHANTILLON I			ECHANTILLON II		
	Valeurs Normales	Valeurs Trouvées	Remarques	Valeurs Normales	Valeurs Trouvées	Remarques
Matière Organique	15	80	très élevée	25	70	très élevée
Phosphates par Méthode DYER	130-140	31	très faible	150	173	élevée
Soufre	60-70	38	faible	75	32	faible
Bases échangeables						
- chaux	500-1700	10	extrêmement faible	1000	140	extrêmement faible
- magnésie	100-110	4	extrêmement faible	100	79	faible
- potasse	100-110	7	très faible	100	107	normal
- soude	5-8	5	normal	40-50	31	normal
Fer	100-150	1765	extrêmement élevé	550-80	700	très élevé
Manganèse						
- Réductible	12-15	10,2	un peu faible	10	8,25	faible
- Echangeable	1-1,5	1,5	un peu élevé	0,5	2,50	élevé
Cuivre	0,5-1	0,3	un peu faible	0,5-1	0,13	très faible

Les techniques utilisées pour des dosages sont les suivantes :

Ions minéraux (exprimés en p.p.m)

- Phosphates : par colorimétrie ; méthode au nitro-molybdo-vanadate d'ammonium.
- Soufre : au colorimètre à 460 mμ
- Sodium, magnésium, calcium, potassium, fer, manganèse et cuivre : par photométrie de flamme.

Matière organique (exprimée en parties pour 1 000)

C'est la méthode classique par oxydation. A deux grammes de l'échantillon de terre desséchée on ajoute 20 cm3 de SO_4H_2 concentré et 10 cm^3 de $Cr_2O_7K_2$ N. On agite une minute et on laisse reposer une demi heure. On ajoute 50 cm^3 d'eau distillée, on homogénéise et on laisse reposer une nuit. On mesure l'absorption au colorimètre à une longueur d'onde de 5 300 angströms. Un tableau d'étalonnage permet de connaître la quantité de matière organique présente dans l'échantillon.

PREMIERE - PARTIE

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE DES SOLS

CHAPITRE I

APERCU DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA STRUCTURE ORGANIQUE DES SOLS

Le choix d'un solvant d'extraction étant fonction de la structure des substances à extraire, il nous a semblé intéressant de faire le point des connaissances actuelles en ce domaine.

Pendant longtemps, le sol a été uniquement considéré comme un milieu physico chimique statique Depuis quelques années cette notion a évolué et nous savons à l'heure actuelle que le sol s'apparente de plus en plus aux milieux biologiques sans cesse en transformation (1 13). La difficulté d'étude des substances organiques se traduit déjà par l'imperfection et surtout l'imprécision des systématiques actuelles en cette matière. Les différents auteurs, outre les produits organiques simples : acides aminés, acides minéraux et organiques les plus courants distinguent les fractions suivantes :

1 - Acides fulviques solubles dans les solutions alcalines, formés de :

- Polysaccharides
- Composés uroniques
- Acides aminés
- Composés tanniques

On peut distinguer dans cette fraction :

a) acides fulviques libres comprenant les acides organiques et les composés phénoliques.

b) acides fulviques liés aux acides humiques comprenant des uronides et des polysaccharides, l'ensemble étant adsorbé sur les acides humiques

2 - Acides humiques insolubles dans les solutions alcalines subdivisés en :

a) acides humiques bruns
provenant de l'oxydation de la lignine (19, 30) pauvres en azote et facilement séparés des argiles.

b) acides humiques gris
produits de synthèse microbienne (11, 12, 21) riches en azote, formant des complexes argilo-humiques stables.

3 - Polyuronides et polysaccharides

dont l'éventail s'étend des composés les plus solubles (acides fulviques) aux composés à grosses molécules insolubles même dans la soude.

Comme on peut le voir, ces distinctions sont établies surtout en fonction des différences de solubilité et il est évident qu'en changeant de méthodes d'extraction, il faudra établir de nouvelles classifications. C'est ainsi qu'en s'appuyant sur des procédés d'extraction différents, Laatsch (22) distingue :

1 - Une fraction extraite par le mélange benzène-éthanol : résines, cires

2 - Une fraction soluble dans les solutions alcalines

a) - non précipitable par SO_4H_2 : acidesfulviques

b) - précipitable par SO_4H_2

- précurseur des acides humiques (complexes humo-lignine)
- acides humiques gris
- acides humiques bruns

3 - Une fraction insoluble dans les solutions alcalines

a) hydrolysable par l'acide chlorhydrique 6N
- certains acides humiques liés aux argiles
- polyuronides

b) non hydrolysable par ClH 6N
- lignine peu transformée
- complexes peu connus à azote hétérocyclique
- acides humiques à azote hétérocyclique et liés aux argiles (réfractaires au traitement précédent)

Toutes ces notions sont schématisées dans le tableau I

L'imprécision de ces fractions suivant les modes utilisés, le chevauchement des différentes divisions qui fait que suivant leur état de polymérisation, des molécules voisines, mais de degrés de condensation différents risquent d'être rangées dans deux nomenclatures différentes, mettent l'accent sur l'ambiguité des classifications.

Fraction I soluble dans les solvants organiques

Cires, résines....

Fraction II soluble dans les solvants alcalins

- non précipitable par SO_4H_2 : acides fulviques
- précipitable par SO_4H_2 :
  - précurseurs des ac. hum.
  - ac. humiques gris
  - ac. humiques bruns

Fraction III insoluble dans les solvants alcalins

- Hydrolysable par ClH 6N
  - ac. humique + argiles
  - polyuronides
- non hydrolysable par ClH 6N
  - lignine peu transformée
  - composés hétérocycliques
  - ac. hum. hétérocycliques + argiles

T A B L E A U I

CHAPITRE II

METHODES D'EXTRACTION

D'après ce qui précède, le choix de ou des méthodes d'extraction est le point initial et primordial pour aborder des études de structure. Les procédés d'extraction actuels sont fonction du but à atteindre :

- extraction séparée des différentes fractions organiques, acides fulviques ou acides humiques, par exemple, par des solvants plus ou moins spécifiques de ces types de composés
- extraction la plus totale possible de l'ensemble de la matière organique.

La séparation classique : acides humiques, acides fulviques ne reposant pas sur une différenciation chimique absolue, nous nous sommes attachés plus spécialement à l'étude des moyens d'extraction non spécialisés la plus complète possible.

Le problème de l'analyse des matières organiques des sols se trouve posé à l'instant même où l'on se propose d'extraire des composés définis de leur milieu. L'usage des solvants classiques, éther, alcool, etc... ne permet d'extraire que peu de substances. Nous devons toutefois remarquer que des essais personnels au moyen d'alcool isoamylique et de pyridine semblent donner des résultats encourageants.

1) Méthode Chaminade

Dans les limites que nous nous étions imposées, la méthode d'extraction de Chaminade, (7), qui suit une méthode de dosage de la matière organique, semblait répondre à nos besoins. Cette technique consiste en l'extraction de la matière organique par une solution à 3 % d'oxalate d'ammonium. Partant de l'extrait obtenu, on précipite les acides humiques par l'acide sulfurique et on dose ensuite par manganimétrie, après élimination préalable de l'oxalate d'ammonium. Ce qui nous intéresse ici, n'est pas le dosage de la fraction humique, but final de la méthode préconisée par Chaminade, mais la séparation par l'oxalate d'ammonium de la matière organique. Cette méthode, pour le but que nous nous étions fixés, présente un inconvénient majeur : la difficulté d'élimination

de l'oxalate d'ammonium qui interfère pour la suite de nos études. Ceci explique que nos premiers efforts ont tendu à établir une méthode basée sur le même principe mais utilisant un agent solvant facile à éliminer.

2) Principe de la méthode au carbonate d'ammonium

Notre choix s'est porté sur le carbonate d'ammonium, composé comparable à l'oxalate d'ammonium, mais intéressant par le fait qu'il permet une investigation ultérieure plus facile. Pour obtenir la plus grande efficacité possible du solvant, nous pratiquons une succession d'extractions à l'aide de solutions de carbonate d'ammonium sur le même échantillon de terre, jusqu'à ce que les solutions ne soient plus d'aucune efficacité. De même, nous ferons des extractions parallèles à l'aide d'oxalate d'ammonium de façon à pouvoir mener une étude comparative.

3) Technique de la méthode au carbonate d'ammonium

Les travaux s'étant effectués sur un échantillon de terre de TARON (Basses-Pyrénées), aux caractéristiques précisées plus haut, 60 grammes de terre sont mises en suspension dans 300 cm^3 d'une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium N/5 et non 3 % comme le préconisait Chaminade, cette modification étant introduite en vue de diminuer la concentration en oxalate dans nos solutions.

L'ensemble est soumis à une agitation mécanique continue de 72 heures à l'aide d'un agitateur électrique rotatif (en prenant bien soin de régler l'appareil à une vitesse assez grande pour permettre une agitation énergique de l'ensemble, mais qui reste tout de même assez faible pour éviter un début de centrifugation, résultat contraire au but recherché). Cette phase d'agitation effectuée, on sépare, par centrifugation, la terre de la solution. Le solvant s'est fortement coloré en brun. On répète ces extractions jusqu'à ce que le solvant demeure limpide. Les différentes solutions sont rassemblées et concentrées à température modérée de façon à obtenir un volume de 300 cm^3.

Parallèlement, sur 60 grammes prélevés sur le même échantillon de terre, on opère comme précédemment, à l'aide cette fois d'une solution aqueuse de carbonate d'ammonium M/2 : agitation mécanique de 72 heures à la même vitesse, centrifugation et concentration. Là encore, nous constatons que les solutions obtenues sont très colorées, un peu moins cependant que les précédentes. Afin de compa-

rer les propriétés extractives des deux méthodes, nous avons procédé au dosage de la matière organique restant sur l'échantillon de terre après l'une ou l'autre méthode d'extraction.

Après extraction oxalatée, il reste : 48 °/.
et après extraction carbonatée, il reste : 51 °/.

Ces nouveaux dosages nous révèlent la présence encore importante de matière organique.

Pour tenter d'extraire celle-ci d'une manière plus complète, nous avons traité les terres, après action de l'oxalate et du carbonate, par les différents solvants organiques : chloroforme, tétrachlorure de carbone, alcool éthylique, acétone, mais sans résultat. L'action des bases minérales, par contre, se révéla très efficace.

4) Principe et technique des reprises ammoniacales

Le choix, parmi les bases minérales à notre disposition fut assez facile. En effet, la soude 6N donne effectivement de bons résultats. Alors que les extractions originales n'étaient plus d'aucune efficacité, une solution de soude 6N, après agitation répétée dans les mêmes conditions que précédemment nous fournit un extrait d'une coloration brune encore plus accentuée que celle constatée pendant les premières expériences.

Cette méthode présente un inconvénient : la difficulté d'éliminer la soude et l'obstacle qui s'en suit pour une étude ultérieure. L'ammoniaque 6N par contre, outre le fait qu'elle constitue une modification intéressante, ne présente aucun des inconvénients précédents.

La quantité extraite par l'ammoniaque après traitement oxalaté ou carbonaté, nous montre combien de telles extractions étaient incomplètes.

Il restait à vérifier ce qui résulterait d'une extraction ammoniacale directe pratiquée sur la terre avant tout traitement. Nous avons donc traité la même terre par une solution d'ammoniaque, mais cela sans résultat notable : pour extraire des produits organiques, le traitement à l'ammoniaque doit suivre celui à l'oxalate ou au carbonate. Cette remarque nous a conduit à faire suivre les extractions oxalatées ou carbonatées d'une nouvelle extraction, en tout point identique à celle décrite précédemment, mais en utilisant comme solvant une solution ammoniacale 6N.

5) Reprises au carbonate et à l'oxalate

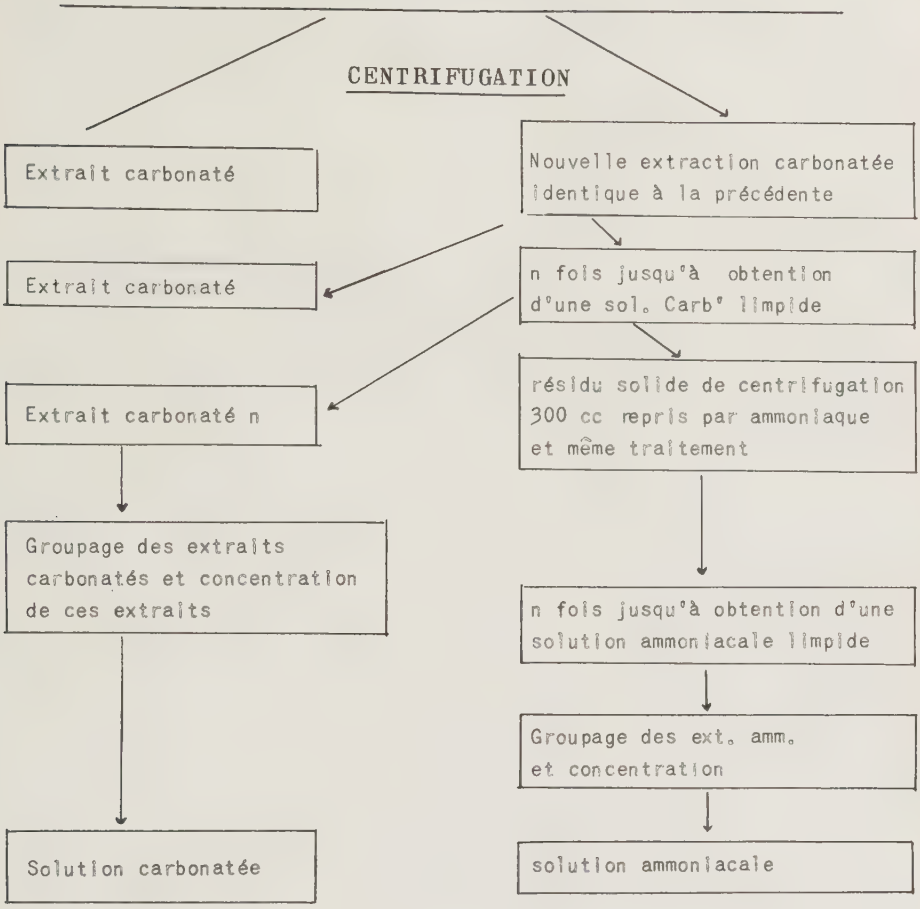
Après cette double extraction successive, nous avons fait subir aux terres une nouvelle attaque par le premier solvant employé : carbonate d'ammonium ou oxalate d'ammonium. Malgré plusieurs essais, la solution demeure limpide ; tout se passe, pour ces solvants, comme s'il n'y avait plus de matière organique. En fait de nouveaux dosages de la matière organique effectués sur les échantillons de terre ainsi traités nous ont donné les résultats suivants :

Après reprise ammoniacale de l'extrait oxalaté il reste : 24,5 °/..

Après reprise ammoniacale de l extrait carbonaté il reste : 27 °/..

A la lumière de ces résultats, nous proposons une nouvelle méthode d'extraction schématisée comme suit :

60 gr. de terre : extraction par agitation 72 h avec 300 cm^3 d'une solution de $CO_3(NH_4)_2$ M/2



6) Remarques et conclusions

La succession des deux solvants oxalate-ammoniaque ou carbonate-ammoniaque conduit à des quantités totales de matière organique beaucoup plus fortes que celles qui ont pu être extraites jusqu'à maintenant par un seul solvant.

Proportionnellement, le traitement ammoniacal après extraction carbonatée est sensiblement plus actif qu'après extraction oxalatée. Cette observation confirme celles que nous avons faites précédemment, à savoir que l'extraction au carbonate est un peu moins forte que l'extraction à l'oxalate. La résultante des deux opérations est telle que nous pouvons dire que la somme des extractions carbonate-reprise ammoniacale donne approximativement les mêmes résultats quantitatifs que la somme oxalate-reprise ammociacale.

Les dosages effectués sur chaque échantillon de terre avant tout essai puis à la fin de chaque traitement suivant la technique indiquée plus haut nous en fournissent la preuve.

Par exemple, la terre étudiée a donné les résultats suivants :

1) matière organique initialement présente :	80 °/°°
2) matière organique restante après traitement au carbonate :	51 °/°° (α)
3) matière organique restante après traitement à l'oxalate :	48 °/°° (β)
4) matière organique restante après reprise ammoniacale de la fraction (1) :	27 °/°°
5) matière organique restante après reprise ammoniacale de la fraction (2) :	24,5 °/°°

Ces résultats suggèrent les commentaires suivants

1) De tous ces dosages, seul celui opéré sur la fraction oxalatée est un peu imprécis. En effet, le dosage que nous effectuons est un dosage par oxydation de la matière organique. Or, malgré les lavages répétés, la terre traitée, soumise au traitement à l'oxalate, renfermera toujours des traces d'oxalate qui, du fait de son caractère réducteur, faussera quelque peu le résultat en donnant des chiffres par excès.

2) Il n'en est pas moins vrai que les observations précédentes se trouvent confirmées ici :

a) l'oxalate d'ammonium se montre légèrement plus efficace que le carbonate d'ammonium

b) par contre la reprise ammoniacale du traitement au carbonate est plus efficace que son homologue à l'oxalate

c) la somme des deux opérations est approximativement la même.

3) Remarquons l'efficacité des traitements décrits puisque au total 70 % de matière organique est extrait dont 30 % par les seules reprises ammoniacales!

En conclusion, à la suite de cette mise au point, nous pouvons avancer une remarque quant au choix des solvants d'extraction et leur mode d'action. Il est maintenant admis que la matière organique existe dans les sols en partie sous forme de complexe organo-métallique (4, 5, 8, 15, 16, 17, 25), ceci étant rapproché du fait que tous les solvants utilisés : carbonate, oxalate, fluorures (10) E.D.T.A. (9) etc... sont des complexants ou agents de précipitation énergique de ces métaux. L'action de tels solvants doit, dans une certaine mesure, extraire le métal de son complexe par précipitation ou déplacement. Le squelette organique libéré peut alors passer en solution. Les composés organiques déplacés possédant une structure ionique ou partiellement ionique, le pH du solvant jouera également sur le produit d'extraction d'où l'influence bénéfique du traitement par les bases. Cela explique la nouvelle extraction importante due à l'action de l'ammoniaque.

CHAPITRE III

HYPOTHESES EMISES SUR LE MECANISME D'EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE

Afin d'être plus complet sur ce chapitre concernant les moyens d'extraction, il nous a semblé indispensable de comparer les principes théoriques des méthodes proposées, à ceux de la méthode Chaminade qui nous a servi de point de départ.

Nos observations personnelles sur les solvants au carbonate, à l'oxalate, et leurs reprises ammoniacales, nous ont amenés à imaginer également un mécanisme d'extraction.

Principes de la méthode d'extraction

Comme nous l'avons fait remarquer, il est curieux de constater que la presque totalité des méthodes d'extraction fait appel à des corps précipitants des ions minéraux : pyrophosphates, oxalate, etc... En fait, il faut distinguer deux actions différentes :

a) l'action des alcalis, dont la soude diluée, qui dissout très bien les composés humiques acides (H^+) qu'elle sature d'ions Na^+

b) l'action des sels alcalins (oxalate d'ammonium, pyrophosphate de sodium ou fluorure de sodium) qui dissolvent très incomplètement les humus acides ; par contre ils agissent très efficacement sur les humates calciques car, formant avec le calcium des sels insolubles, ils provoquent la substitution de l'ion Ca^{++} par l'ion NH_4^+ ou Na^+ :

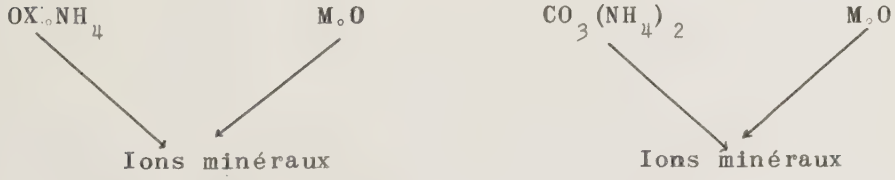
Humus Ca^{++} + oxalate d'ammonium ⟶ oxalate Ca^{++} + Humus NH_4^+

D'après ce principe, ce seraient surtout les humates calciques qui seraient extraits par l'oxalate d'ammonium. Or, parmi les échantillons de terre que nous avons étudiés en détail les dosages effectués après les extractions proposées nous démontrent qu'une grande quantité de matière organique est extraite. Si l'on consulte la compo-

sition minérale de chacun des échantillons, nous constaterons que, parallèlement à la matière organique, c'est surtout le fer et non le calcium qui existe en quantité très élevée. De plus, le principe couramment adopté n'explique qu'imparfaitement l'efficacité des reprises ammoniacales.

En fait, nous pensons que l'action précipitante de l'oxalate et du carbonate ne se borne pas au seul calcium mais à tous les ions présents, notamment le fer, par ailleurs susceptible d'interférer avec le calcium. La fixation des humates calciques par l'oxalate ne se limite pas aux seules fractions humiques ni au seul calcium mais à l'ensemble de la matière organique et des autres ions minéraux. Dans notre cas précis, sans doute est-ce le fer qui joue un rôle important.

Par l'intermédiaire de l'oxalate d'ammonium ou du carbonate d'ammonium employés, il se forme probablement une liaison avec les ions minéraux présents dans la terre. Ces ions minéraux seraient extraits en entraînant une partie de la matière organique liée à eux dans la terre. (29). Il nous paraît permis d'envisager un schéma global suivant :



Le mécanisme partiel serait le suivant :

1) par l'oxalate ou le carbonate d'ammonium

- action de l'oxalate et du carbonate qui forment avec les ions minéraux des composés dont les constantes de dissociation sont inférieures à celles que ces mêmes ions minéraux forment avec la matière organique, ces composés entraînant une certaine quantité de matière organique avec eux.

- action dissolvante partielle de l'ammoniaque libérée de l'oxalate et du carbonate, qui dissoudrait la matière organique entraînée.

2) par l'ammoniaque 6N

- action complémentaire sur la matière organique décom-

plexée (mais toujours présente dans la terre), de l'ammoniaque à assez forte concentration (6N) qui dissoudrait et extrairait donc cette grosse partie de la matière organique de l'échantillon, et hydrolyse partielle (humification).

On le voit, contrairement à l'hypothèse première, la solution envisagée nous permet :

- de comprendre l'excellente extraction à laquelle nous arrivons grâce à cette grosse quantité de fer présente dans nos échantillons de terre

- d'expliquer l'efficacité de l'action ammoniacale qui prend dès lors toute sa valeur.

De plus, on peut imaginer que le squelette minéral de la terre, l'argile par exemple, joue le même rôle qu'une résine échangeuse d'ions. De nombreuses expériences ont pu montrer que les composés synthétiques, cellulosiques, pectines etc, sont fortement adsorbées sur des argiles minérales (26).

Dans ces conditions, il est évident qu'un des rôles du solvant doit être d'éluer la matière organique de son support minéral tout comme ces mêmes solvants sont utilisés pour éluer les produits retenus sur les colonnes de résine.

Enfin, nous l'avons déjà indiqué, une méthode d'extraction n'est valable que dans la mesure où elle permet une meilleure investigation. Or, l'oxalate est très gênant, surtout pour une étude chromatographique. L'expérience suivante illustre cette opinion : ajoutons goutte à goutte dans 2 tubes à essais contenant un extrait oxalaté, une solution saturée de chlorure de calcium dans l'un et une solution saturée de chlorure ferrique dans l'autre. Il se forme dans chacun des tubes un précipité dû à l'excès d'oxalate présent, précipité dont l'observation attentive révèle :

- que l'oxalate de calcium et l'oxalate de fer formés, entraînent la totalité de la matière organique présente, le surnageant, dans les deux cas, étant tout à fait limpide. Un dosage effectué dans le surnageant indique l'absence totale de matière organique.

- que dans ce précipité il existe en réalité deux parties :

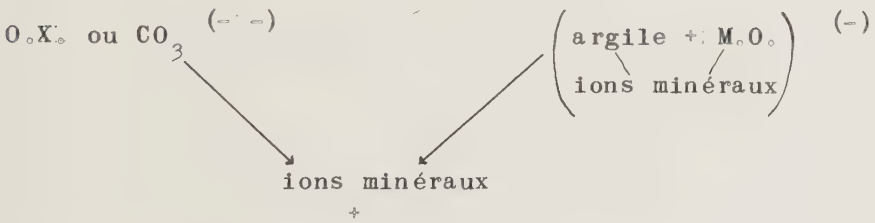
a) l'une qui précipite directement, blanche dans le cas de l'oxalate de calcium, brune dans le cas de

l'oxalate de fer

b) l'autre, sorte de gel colloïdal précipitant en second, comprenant la matière organique présente dans l'extrait.

La matière organique a donc bien suivi dans les deux cas les précipités d'oxalate de calcium et de fer dont il est impossible de la séparer.

En outre, le caractère colloïdal examiné précédemment nous incline à penser que non seulement la matière organique, mais l'argile contenant entre ses mailles la molécule organique à laquelle elle est aussi liée par les ions métalliques, est extraite selon les schémas suivants :



C'est le cas notamment des acides humiques dits bruns, souvent liés à l'argile par des ions Fe^{+++}, Al^{+++}, Ca^{++}. Cet ensemble argile + matière organique formerait un groupe anionique électro-négatif s'insolubilisant à la suite de l'oxalate et du carbonate.

Retenant ce caractère de complexité révélé par les méthodes d'extractions employées, nous nous attacherons d'abord à l'étude de la structure d'ensemble de la matière organique.

DEUXIEME - PARTIE

ETUDE DE LA STRUCTURE D'ENSEMBLE DE LA MATIERE ORGANIQUE

CHAPITRE I

ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE ULTRA-VIOLETTE

Des essais préliminaires pratiqués au laboratoire de l'école d'Agriculture de Purpan (27) ayant montré l'existence d'un rapport entre l'absorption ultra-violette et la matière organique extraite, nous avons procédé à une étude spectrophotométrique dans cette région du spectre. Nous avons utilisé successivement deux spectrophotomètres à double faisceau : un Beckmann DB et un DK II

A partir de vingt échantillons de terre représentant autant de types différents de sols nous avons fait:
- une extraction à l'oxalate à l'aide de 300 cm3 d'oxalate d'ammonium N/5 selon la technique mise au point précédemment.
- une extraction au carbonate, parallèle
- deux extractions ammoniacales correspondantes.

Afin de réduire les absorptions dues aux solvants employés et à la partie minérale présente dans nos solutions, nous devions nous entourer de certaines précautions.

- Pour diminuer l'absorption due aux premiers, nous ferons nos mesures en utilisant comme témoin une cuve contenant le solvant employé pour l'extraction.

- L'absorption due à la partie minérale extraite en même temps que la matière organique sera appréciée au moyen d'une solution synthétique contenant la dose maximale possible dans le sol des principaux ions minéraux.

Toutes ces conditions nous ont amenés à faire les différents spectres suivants :

1) extractions à l'oxalate

En double faisceau : les échantillons à l'oxalate avec l'oxalate d ammonium comme référence d'une part, et la solution d oxalate d'ammonium ayant servi de solvant avecde l'eau distillée comme témoin.

2) extractions au carbonate

En double faisceau : les échantillons au carbonate avec

le carbonate d'ammonium comme référence, et le carbonate d'ammonium ayant servi de solvant aux extractions, l'eau distillée servant de référence.

3) extractions ammoniacales

Le solvant en l'occurrence l'ammoniaque, n'est pas ici aussi gênant que dans les cas précédents.

4) solutions synthétiques

La solution synthétique composée comme suit : pour 100 cm^3 de solution à l'oxalate ou au carbonate :

Phosphate (exprimé en P_2O_5)	: 4 000 ppm	introduit	s/forme de	PO_4H_2K
Fer	: 12 000 ppm	"	"	$So_4Fe,So_4(NH_4)_2,7H_2O$
Cuivre	: 200 ppm	"	"	$SO_4Cu,5H_2O$
Magnésium	: 2 000 ppm	"	"	$SO_4Mg,7H_2O$
Manganèse	: 400 ppm	"	"	$Cl_2Mn,4H_2O$
Potassium	: 2 000 ppm	"	"	ClK

a été examinée en double faisceau avec comme témoin l'oxalate d'ammonium ayant servi de solvant.

A partir de solutions obtenues il l'a été indiqué dans ces méthodes d'extraction, nous avons utilisé deux dilutions, suivant l'intensité de l'absorption :
- au 1/20ème
- au 1/100ème, lorsque l'absorption a été trop forte.
les témoins subissant également les mêmes dilutions.

Résultats

Les courbes tracées de 2 000 Å. à 3 200 Å présentent toutes un seul sommet plus ou moins étalé.

1) Extractions à l'oxalate

a) Deux types de courbe peuvent être seulement définis.
- Un type se rapportant aux solutions les moins colorées, les moins riches en matière organique avec un maximum d'absorption aux alentours de 2 800 Å. et un minimum vers 2 500 Å. (courbe I)

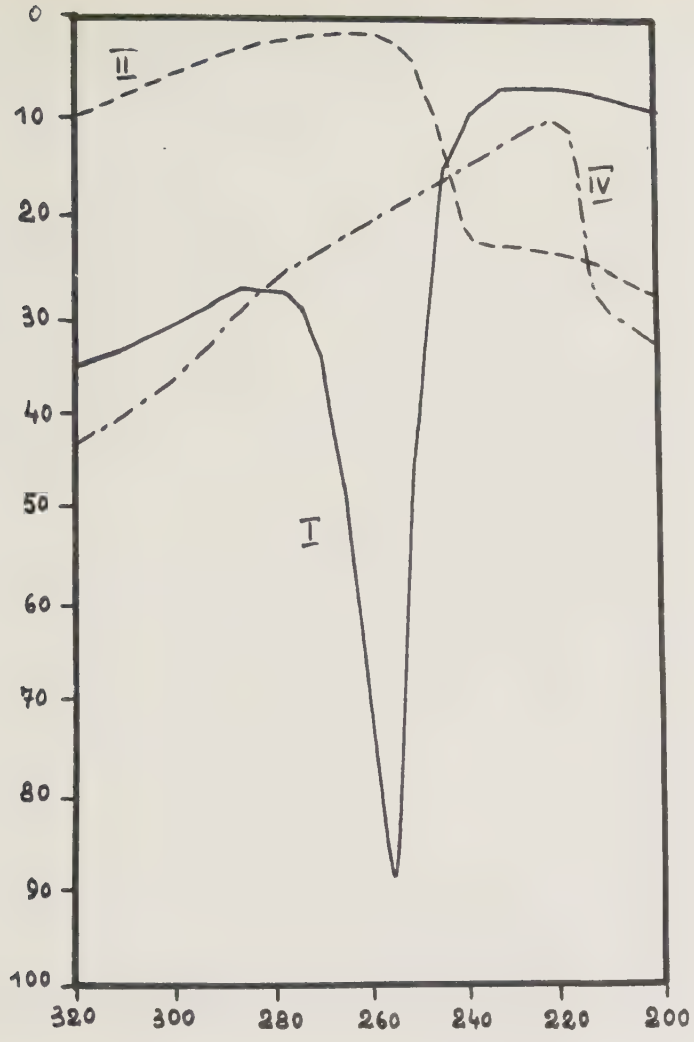


Fig. N° 1

TERRE n° I : Matière Organique : 80 pour mille.

Courbe II : Extraction par l'oxalate d'ammonium
Courbe IV : Extraction par le carbonate d'ammonium.
Courbe I : Extraction par l'oxalate d'ammonium d'une terre n° 10 ayant les caractéristiques suivantes :

Matière organique	:	25 pour mille
Fer	:	518 pour mille
Calcium	:	1 380 pour mille

- Un autre type de courbe correspondant aux solutions les plus intensément colorées avec un maximum d'absorption à 2 600 Å. environ* et un minimum moins net à 2 400 Å. (II et II bis).

* Remarque : L'aspect étalé des maxima ne nous permet pas de préciser avec exactitude la longueur d'onde. C'est pourquoi nous donnons seulement un ordre de grandeur.

b) La courbe d'absorption de l'oxalate lui-même, d'allure très plate jusqu'à 2 800 Å., donc d'absorption négligeable jusque là, puis montant brutalement, jusqu'à la limite de la région étudiée (courbe n° III).

2) Extractions au carbonate

Nous obtenons un seul type de courbe, différente de celles obtenues avec les extractions précédentes. Le maximum d'absorption est cette fois très bien précisé à 2 200 Å. (courbe n° IV et IV bis).

La courbe d'absorption du carbonate seul est presque identique à la courbe III. La pente de la courbe obtenue augmentant à partir de 2 500 Å. Au lieu de 2 800. (courbe n° V).

3) Extractions ammoniacales

a) Postérieures aux traitements à *l'oxalate* : tracé d'allure étalée (courbe n° VI)
b) Postérieures aux traitements au *carbonate* : même résultat qu'avec l'extrait précédent (courbe n° VII).

4) Solutions synthétiques

Nous obtenons des courbes d'absorption moins importantes. Elles ont en effet une allure très proche de celles des extraits organiques ; mais nous devons remarquer que les solutions synthétiques sont diluées au 1/10 seulement et non au 1/20 ou au 1/100 comme dans les extraits organiques étudiés. La participation des ions minéraux en tant que entités individuelles dans l'absorption ultra-violette est donc réelle ; elle se situe dans les mêmes longueurs d'ondes, mais il y a une différence quantitative qui fait que l'on doit lui attribuer non la totalité, mais, tout de même, une forte partie de l'absorption. Le maximum est situe vers 2 800 Å; (courbe n°VIII)

DISCUSSION

Malgré l'utilisation du double faisceau, les solvants carbonatés et oxalatés sont en telle proportion

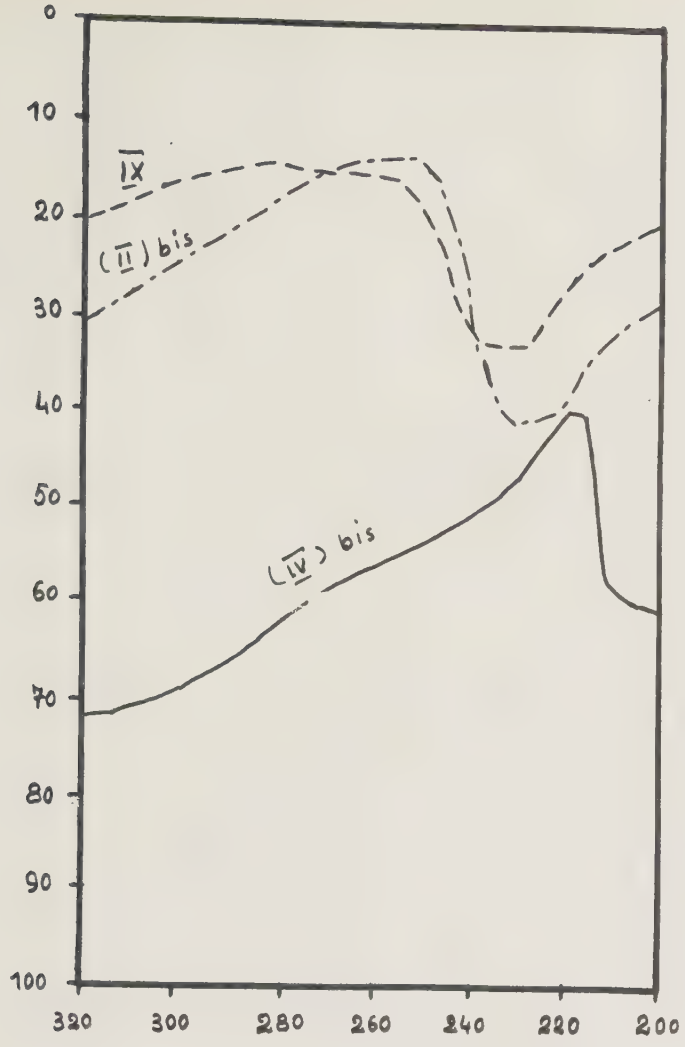


Fig. N° 2

TERRE n° 2 (dans les 2 cas) : Matière organique 70 pour mille

Courbe (II) bis : Extraction par l'oxalate d'ammonium
Courbe (IV) bis : Extraction par le carbonate d'ammonium
Courbe IX : Extraction par l'oxalate d'ammonium, puis pH ajuste à 7

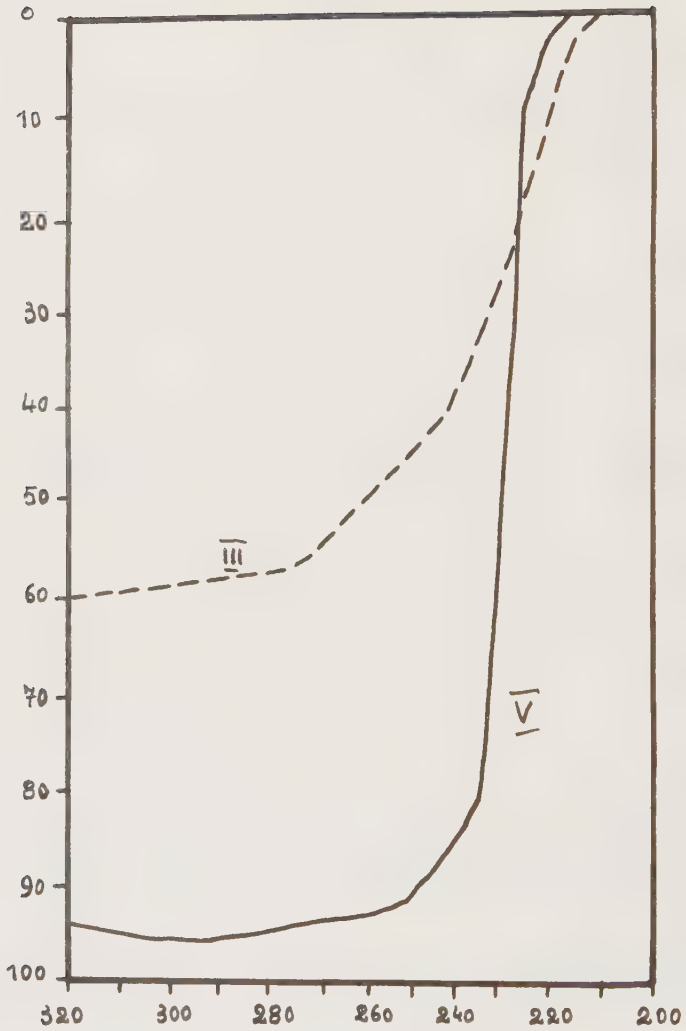


Fig. N° 3

Courbe (III) : Oxalate d'ammonium

Courbe (V) : Carbonate d'ammonium

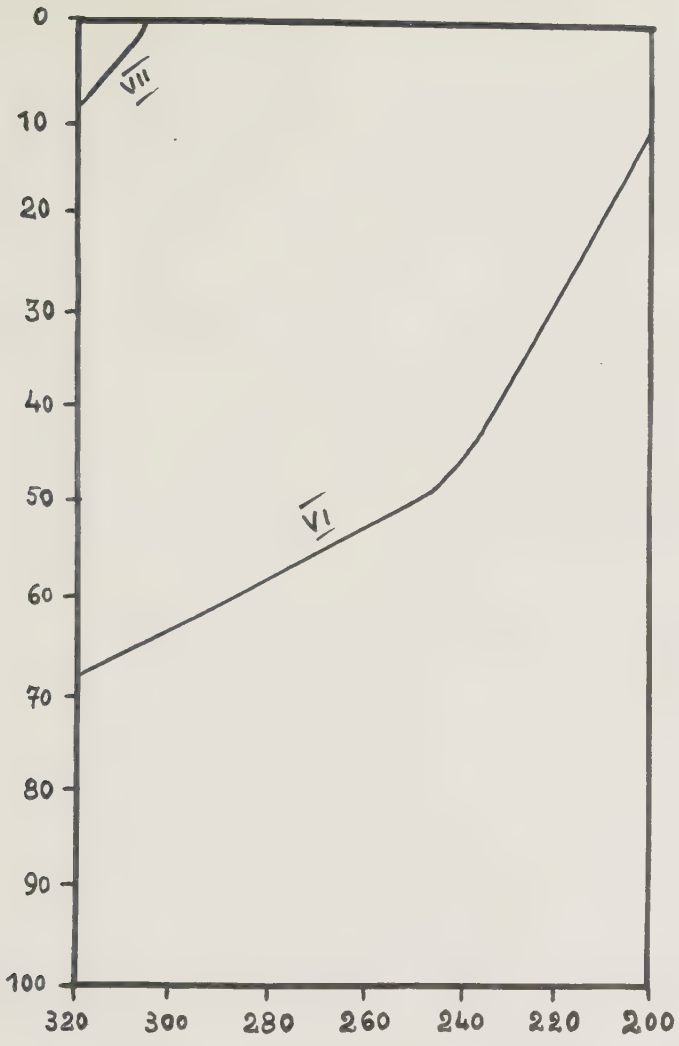


Fig. N° 4

TERRE n° 2

Reprises par l'ammoniaque

Courbe (VI) : après l'extraction par l'oxalate d'ammonium

Courbe (VII): après l'extraction par le carbonate d'ammonium

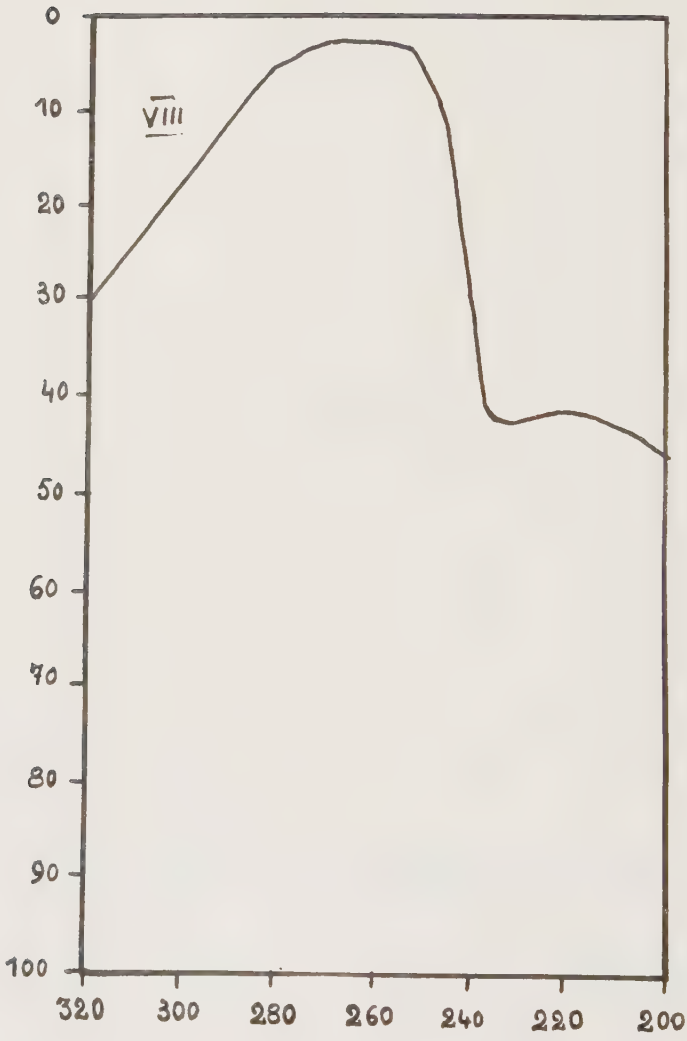


Fig. N° 5

Courbe (VIII) : Solution synthétique

Témoin : oxalate d'ammonium

qu'ils interfèrent dans l'absorption. Un simple examen de leur tracé respectif nous le prouve. En effet, jusqu'à 2 800 Å pour le solvant carbonaté et 2 500 Å pour le solvant oxalaté, l'absorption est très faible sinon négligeable. Par contre, à partir de ces 2 longueurs d'ondes, les courbes montent brutalement. Il est indéniable que dès lors, plus rien de valable ne peut être conclu.

Outre les interactions dues aux solvants, la matière organique extraite, formée d'un ou plusieurs complexes, donne une absorption massive de l'ensemble moléculaire. De très nombreux groupements chimiques sont sans doute présents dans les extraits . Pour être valable, une telle étude spectrophotométrique doit se faire sur des extraits préalablement traités par un moyen de scission choisi de façon à séparer les différents complexes présents.

Par contre, l'analyse spectrophotométrique aura au moins prouvé que les ions minéraux par eux-mêmes ont déjà une incidence notable sur le résultat final. Il faut cependant ajouter que leur interaction avec la matière organique peut sans doute modifier cette remarque par la formation vraissemblable de composés organo-métalliques colorés tels ceux du fer.

C'est ainsi par exemple que Hill-Cottingham (14) a pu faire l'étude de l'absorption ultra-violette des chélates ferriques avec l'E.D.T.A. Ceux-ci ont un maximum d'absorption à 2 600 Å et à cette longueur d'ondes les agents chélatants libres ou leurs chélates calciques n'interfèrent pas.

A 2 600 Å , du mélange :

$E.D.T.A.$
$Fe^{+++}.E.D.T.A.$
$Ca^{++}.E.D.T.A.$

seule la concentration en Fe^{+++}. E.D.T.A. influe sur l'absorption.

D'autres auteurs (31) ont étudié les spectres ultra-violet et visible des extraits organiques : VLES et GEX (33) ont montré que des extraits aqueux de sols différents conduisaient à des courbes semblables avec des pics marqués à 2 720 Å. Ce chiffre, proche des notres, voisin de ceux de Hill Cottingham, montre l'importance de l utilisation de la spectrophotométrie ultra-violette

comme dosage de la matière organique des sols en association avec les ions minéraux. Plus spécifiquement, Kononova se sert de cette technique comme mesure de degré de condensation de la molécule (18).

L'influence du pH n'est pas négligeable car il a un effet marqué, aussi bien dans le cas des chélates ferriques signalé par Hill-Cottinghan que dans notre cas particulier. La courbe n° IX de la figure I montre le changement apporté par l'ajustement à pH 7 de l'extrait ayant donné la courbe I, immédiatement après l'extraction. Nous pensons cependant qu'en conservant le pH dans des limites pré-déterminées, la spectrographie sera très sensible pour l'analyse.

Enfin une dernière remarque s'impose concernant notre hypothèse sur l'entraînement de matières organiques par l'oxalate ou le carbonate, entraînement que nous supposons dû à la formation d'une association organo-métallique. Nous avons insisté sur la possibilité d'être en présence d'un cation tout autre que le calcium, par exemple le fer.

Ceci est vérifié, non seulement par le fait que les terres étudiées sont très riches en fer, mais encore par la forme des courbes d'absorption et la longueur d'ondes de leurs maxima, voisines de celles des chélates ferriques.

Le fait le plus convaincant est l'observation que l'on a pu faire (12) du phénomène suivant. Une colonne de verre remplie de terre brute, placée au-dessus d'un collecteur de fractions, est éluée par des solutions d'oxalate ou de carbonate d'ammonium. Les dosages pratiqués sur les tubes à la sortie de la colonne, montrent que le fer accompagne la matière organique tout au long de l'élution et qu'un tube contenant une quantité de fer supérieure à celle des autres aura également un contenu organique plus important.

Cette observation valable pour le fer l'est probablement pour d'autres métaux, ce qui montre, en élargissant les possibilités d'association organo-métallique, que l'absorption massive dans l'ultra-violet est due à la présence de nombreuses molécules organiques ou associations moléculaires. L'étude de cet ensemble hétérogène ne peut être poursuivie qualitativement par spectrophotométrie

CHAPITRE II

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE D'ENSEMBLE

Il nous a semblé préférable de nous adresser à deux terres différentes, toutes deux riches en matière organique, pour posséder les éléments nécessaires à une étude plus approfondie. Les deux terres utilisées proviennent l'une des Basses-Pyrénées, l'autre des Landes et leurs caractéristiques ont été définies dans l'avant-propos.

Les deux échantillons ont été prélevés et traités selon les techniques décrites précédemment. Après ces traitements, nous avions donc trois solutions pour chaque échantillon :

- solution carbonatée,
- solution oxalatée,
- une reprise ammoniacale

soit six solutions au total.

Ne pouvant préjuger des résultats, nous avons essayé sur chaque échantillon différentes méthodes de chromatographie sur papier de façon à choisir la mieux adaptée à notre étude.

Enfin, le but de ces recherches étant l'étude de la structure moléculaire d'ensemble, nous avons utilisé les révélateurs des groupements chimiques normalement présents dans nos extraits.

1) Méthodes

Les méthodes que nous avons utilisées font appel à la chromatographie de partage sur papier et ne diffèrent que par certains facteurs que nous définirons plus loin.

Nous avons employé le papier Arches 302

- soit découpé successivement en carrés de 14 cm et de 28 cm destinés à des chromatographies descendantes monodimensionnelles ou bidimensionnelles.

- soit découpé en carrés de 18 cm pour les chromatogrammes circulaires.

Nous avons utilisé, selon les cas, des prises d'essai de liquides différents, mesurés à la micropipette graduée pour chromatographie, séchés au séchoir électrique.

Dans les cuves en verre épais, nous utilisons des solvants suivants :

- en phase monodimensionnelle et circulaire :

a) La phase organique du mélange butanal acétique

n. butanol	400 cm^3
acide acétique crist.	100 cm^3
eau distillée	500 cm^3

b) La phase organique du mélange butanol formique

n. butanol	400 cm^3
acide formique	100 cm^3
eau distillée	500 cm^3

c) Le mélange alcool ammoniacal

alcool à 95°
ammoniaque àà

d) Phénol saturé d'eau

Phase bidimensionnelle

1ère dimension : butanol acétique — 2 formules précédemment décrites
2ème dimension : phénol saturé d'eau

Pour ces derniers, en opérant à une température de 22-23°, nous avons adopté en moyenne les temps de migration suivants :
- 6 heures 30 pour le butanol acétique
- 9 heures pour le phénol saturé d'eau

Désirant révéler la présence :

- de groupements aminés
- de groupements carboxyliques
- de groupements peptidiques

- de cétoses
- d'aldoses

Les solutions suivantes nous ont servi de révélateurs :

pour les groupements aminés : une solution de ninhydrine à 0,1 % dans l'alcool à 90°, additionnée de 5 % de collidine (solution n° 1), et une solution d'isatine à 0,2 % dans l'alcool à 1 % d'acide acétique (solution n° 2).

Ces deux révélateurs pulvérisés sur le chromatogramme séché et laissé ensuite à l'étuve 5 minutes pour le premier et 7 minutes pour le second, donnent de très bonnes taches.

- *pour les groupements carboxyliques* : révélation par pulvérisation et séchage à l'étuve à 120° pendant 7 minutes d'une solution contenant :

Glucose	2 gr
Aniline	2 cm^3
Ethanol	20 cm^3
Butanol	60 cm^3
Eau distillée	20 cm^3

- *pour les groupements peptidiques* (CO-NH) selon Smith et Rydon. Exposition des chromatogrammes en vase clos 10 minutes à des vapeurs de chlore. Séchage à température de laboratoire jusqu'à cessation de l'odeur de chlore et pulvérisation avec une suspension aqueuse d'empois d'amidon additionnée d'une solution à 1 % d'iodure de potassium. (solution n° 4)

- *pour les cétoses* emploi d'une solution contenant :

urée	5 gr
HCl 2N	20 cm^3
Alcool 95°	80 cm^3

Pulvérisation et séchage 7 minutes à 120° (solution n° 6)

2) Résultats

1) Extractions à l'oxalate

Tous les essais effectués sur ces extraits selon les techniques précédemment décrites

- circulaire

- monodimensionnelle grands et petits chromatogrammes avec les différents solvants.

- bidimensionnelle,

ne font apparaître qu'une seule tache de très faible migration et sensible aux seuls révélateurs des acides aminés et organiques, faisant supposer la présence de groupements aminés carboxyliques. Les prises d'essai sont de 5-15-25-50 microlitres pour les monodimensionnels, de 15-50-100 microlitres pour les bidimensionnels et 100 microlitres pour les circulaires. Seuls les Rf, tous très faibles, se modifient quelque peu selon les solvants utilisés.

2) Extractions au carbonate

Les résultats obtenus avec les extractions carbonatées sont en tout point identiques aux précédentes. Une seule variante aux constatations précédentes : les Rf quoique très bas encore sont cependant légèrement supérieurs aux premiers.

Sensibilité aux seuls réactifs des acides aminés et organiques.

3) Reprises ammoniacales

Sans avoir à redécrire systématiquement les différents essais effectués selon le schéma détaillé plus haut, disons qu'ils se sont soldés eux aussi par des résultats semblables sur de nombreux points. Ainsi, comme précédemment, nous obtenons dans tous les cas une seule tache sensible aux révélateurs des acides aminés et organiques. Cependant, remarquons en outre :

- que le réactif 4 de Smith et Rydon est positif, révélant la présence de liaisons CO-NH absentes dans les expériences directes oxalatées et carbonatées.
- que les Rf sont encore supérieurs aux précédents, ceux des reprises ammoniacales carbonatées étant un peu plus grands que leurs homologues oxalatés.

3) Interprétation des résultats et discussions

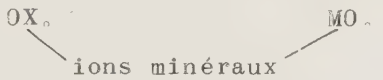
Une première remarque à faire : les résultats donnés par les deux échantillons de terre sont tout à fait semblables : sensibilité aux mêmes réactifs, Rf égaux, ce qui semble donc être favorable à la présence d'un meme type de structure chimique dans les deux cas.

Extractions à l'oxalate

De la présence d'une seule et unique tache ayant les caractéristiques précitées, on peut penser que nous sommes en présence d'un ensemble chimique de masse moléculaire élevée.

De la sensibilité aux révélateurs des acides aminés et organiques, la présence des groupements NH_2 et COOH à la périphérie de la molécule. Très probablement, de nombreux autres groupements chimiques sont présents dans cette structure organique. Il semblerait qu'ils sont engagés dans d'autres liaisons qui, ainsi, les dissimulent aux réactifs.

Rappelons de plus le schéma du mécanisme d'extraction



Ce schéma nous permet aussi d'expliquer, au moins en partie, les résultats décevants obtenus après les études spectrophotométriques et chromatographiques, l'ensemble formant une masse moléculaire importante absorbant et migrant d'un seul bloc.

3) Reprises ammoniacales

Les conclusions précédentes sont aussi valables mais, dans les cas des reprises ammoniacales il y a lieu de faire les remarques suivantes :

- il ne peut être question ici de complexes entre ions minéraux oxalate ou carbonate et matière organique, puisque nous avons employé l'ammoniaque.

- là encore, nous sommes en présence d'une très grosse molécule organique mais les Rf supérieurs et la présence de groupements CO-NH libres, et donc, plus sûrement, de peptides, indiquent que la molécule a déjà subi un début de scission qui n'existait pas dans les précédents essais. Cette remarque est à rapprocher du fait déjà signalé, à savoir que l'ammoniaque n'est efficace qu'à la suite des premiers traitements oxalatés ou carbonatés. Nous avons là, un argument de plus en faveur de l'hypothèse envisagée précédemment, selon laquelle ces premiers traitements délivrent en partie la matière organique des ions minéraux ou du squelette argileux, la solution ammoniacale permettant ainsi son extraction.

CHAPITRE III

ETUDE ELECTROPHORETIQUE

Les études précédentes, spectrophotométriques et chromatographiques ayant démontré la complexité de la molécule organique en présence, il est très difficile, sinon impossible d'en étudier la structure d'ensemble sans l'emploi de technique de séparation ou de scission. Notre intention était donc d'avoir recours à une méthode permettant de dissocier, de scinder en plusieurs fragments cette grosse molécule organique afin d'en révéler et d'en étudier les liaisons intermoléculaires ou intramoléculaires ainsi que les groupements détachés. L'électrophorèse qui met à notre disposition des possibilités étendues nous a semblé être une méthode de choix.

Cette méthode permet par l'action d'une force électrique sur la molécule organique

- de juger la condensation de la molécule
- de séparer certains groupements
- d'apprécier, par le principe des migrations fractionnées, la force de liaison de chacune des fonctions séparées
- de révéler et d'identifier les groupements et les fonctions chimiques isolées.

Toutefois, nous devons admettre que cette méthode présente certains inconvénients :

- l'emploi d'une force de scission qui pourrait se révéler encore très faible.
- l'impossibilité de procéder à une étude très approfondie de la molécule organique, le choix des tampons étant quelque peu arbitraire.

Nous diviserons cette étude électrophorétique selon le plan déjà indiqué dans les précédents chapitres : choix des méthodes, résultats des différentes solutions d'extraction, interprétation des résultats et conclusions.

Cette étude a été poursuivie sur la seule terre des Basses-Pyrénées (terre n° 1).

I) METHODES

Nous avons employé un appareil JOUAN, nous permettant de travailler sous une tension de 15 à 20 volts/cm. pendant le temps de migration désiré, ce qui est dans les normes indiquées par NODA et ses collaborateurs (28).

Les résultats obtenus précédemment nous montrant la forte condensation de la molécule, il semble qu'un temps assez long de migration soit nécessaire. Nous avons cependant entrepris une étude systématique en faisant des électrophorèses fractionnées, échelonnées de la façon suivante : 30 minutes, 60, 90, 120 minutes, 3 heures, 6 h., 12 h, 24 h, 48 h.

Nous nous sommes adressés d'autre part à deux types de tampons :

a) un de Ph 8,9 véronal-véronal sodique employé par JACQUIN pour l'étude électrophorétique des acides humiques (15)

b) un de pH acide 3,9 particulièrement approprié à la détection des groupements aminés.

La composition en est la suivante (3) :

pyridine	3
acide acétique	10
eau distillée	487

Le second tampon s'étant seul montré intéressant, c'est celui que nous avons adopté pour notre expérimentation.

II) RESULTATS

1) Extraits en milieu carbonaté et oxalaté

Les résultats, bien que plus satisfaisants que les précédents n'en sont pas moins encore imprécis et limités, confirmant une fois de plus la structure extrêmement complexe de la molécule et la présence de liaisons intra-moléculaires et inter-moléculaires très fortes.

On peut, dans les 2 cas, après 24 heures puis 48 heures de migration séparer trois bandes ; révélées à la ninhydrine, celles-ci sont colorées en rose (A), jaune (B), violet (C) et légèrement déplacées vers la cathode. (électrophorégramme n° 1).

De plus, tout le long de la bande de migration, de part et d'autre de la ligne de départ on peut mettre en

évidence par le réactif de Smith et de Rydon toute une série continue de chaines peptidiques, démontrant l'extrême richesse en liaisons peptidiques de ces extraits.

Fig. N° 6

SCHEMA N° 1	: Electrophorègramme des extraits oxalaté et carbonaté de la terre n° 1.
Tampon	: Solution acétique PH 3.9.
Révélateur	: Solution à base de ninhydrine
Temps de migration	: 24 heures.
SCHEMA N° 2	: Electrophorègramme des extraits oxalaté et carbonaté de la terre n° 1.
Tampon	: Solution acétique PH 3.9.
Révélateur	: Solution à base de ninhydrine
Temps de migration	: 48 heures
SCHEMA N 3	: Electrophorègramme des reprises ammoniacales oxalatée et carbonatée
Tampon	: Solution acétique PH 3.9.
Révélateur	: Solution à base de ninhydrine
Temps de migration	: 18 heures.

Remarque : La flèche indique la place de la prise d'essai au départ.

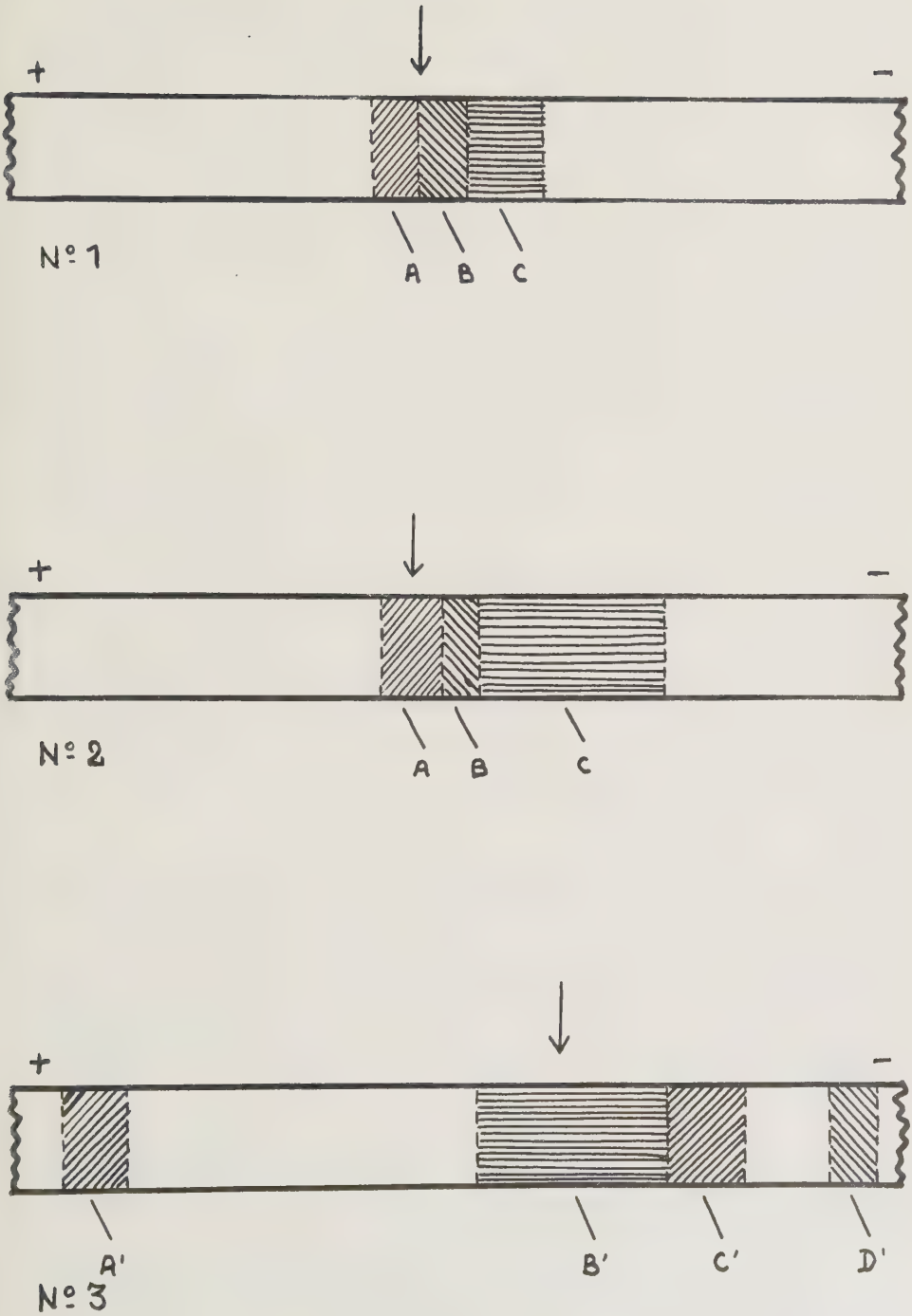


Fig. Nº 6

Enfin, signalons dès 3 heures de migration la présence de corps sensibles à la ninhydrine, sans doute des acides aminés très faiblement absorbés sur la molécule organique, mais existant en quantité beaucoup trop infime pour pouvoir être identifiés.

2) Reprises ammoniacales

Les électrophorèses des solutions ammoniacales, donnent en revanche de bien meilleurs résultats, identiques entre eux, mais différents des précédents.

Après douze heures de migration seulement, nous obtenons dans les deux cas les trois memes bandes dont nous avons parlé dans nos extraits précédents (électrophorégramme me n° 2).

Après 18 heures de migration, ces trois bandes ont fait place à 4 composés : deux à migration cathodique, (C^0 et D^0) un proche de la neutralité électrique à ce pH, (B^0), un à tendance anionique (A^0) (électrophorégramme n° 3, Fig. n° 6.)

En outre, le réactif de Smith et Rydon révèle aussi la présence de très nombreuses chaînes peptidiques.

De plus, d'une façon identique aux précédents extraits carbonatés et oxalatés, mais cela dès une heure 30 de migration, la présence très vague, en raison de la faible concentration, de groupements sensibles à la ninhydrine.

III) RESULTATS ET INTERPRETATION

Cette étude électrophorétique nous permet de remarquer :

1) La présence de très nombreuses chaînes peptidiques dans toutes les extractions et cela, à longueur de migration démontrant par là-même la nature peptidique du composé.

2) La présence dans ces quatre extraits, de trois bandes de colorations violettes, roses, jaunes, représentant sans doute autant de complexes. Leur très petit déplacement, à tendance cathodique :

- nécessité de 24 heures de tension électrique pour leur apparition dans les solutions carbonatées et oxalatées.
- très légère modification après 48 heures nécessité de 12 heures pour les reprises am-

moniacales, peut s'expliquer par une faible ionisation à ce pH et par la présence d'une masse moléculaire élevée.

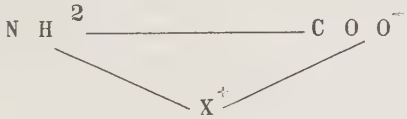
Ce résultat rejoint celui de M.N KONONOVA et N.A. TITOVA (20), qui par électrophorèse d'extraits organiques de terre par le pyrophosphate de sodium ont séparé également trois fractions analogues.

3) La probabilité d'existence de groupements aminés, à très faible concentration dont la grande mobilité fait penser à des acides aminés libres ou faiblement adsorbés sur l'ensemble organique, WALDRON et MORTENSEN (34) ayant montré que la mobilité des acides aminés, si elle peut etre influencée par les composés polymérisés, est cependant semblable à celle rapportée par LEDERER (24).

4) L'existence, dans les reprises ammoniacales, de groupements aminés très nettement révélés au bout de 18 heures de migration.

Ces groupements peuvent être :

- soit des acides aminés libres
- soit des amino-acides simples retenus près du complexe organique sous forme de certaines combinaisons



- soit des complexes à poids moléculaire élevé, comprenant des groupements aminés.

La première hypothèse est peu vraisemblable. En effet, des acides aminés libres se déplacent beaucoup plus rapidement et au bout de 18 heures seraient sortis de la bande électrophorétique.

La deuxième hypothèse, quoique plus vraisemblable, ne résiste pas non plus à un examen approfondi. En effet, la libération de tels acides aminés, engagés sous forme de certaines combinaisons avec la molécule organique nécessiterait sans doute une action électrique prolongée, de l'ordre de celle constatée (18 h.) mais, une fois libérés, ils migreraient rapidement. Or, un électrophorégramme révèlé après 20 heures de migration, indique la présence de mêmes groupements avec un déplacement très légèrement supérieur.

La troisième hypothèse semble donc la plus plausible.

Ces différentes remarques nous permettent les conclusions suivantes :

1) la similitude des fonctions révélées avec l ensemble des quatre solutions nous incline à penser à une composition chimique semblable.

2) les résultats obtenus avec ces quatre extraits, identiques en tout point deux à deux, confirmeraient l'hypothèse selon laquelle nous sommes en présence d'une même structure chimique pour les extractions oxalatées et carbonatées d'une part et les solutions ammoniacales de l'autre.

3) Enfin, la plus grande migration et le nombre plus élevé de groupements aminés des reprises ammoniacales nous confirment aussi la probabilité d'un début de scission de la molécule organique présente dans ces solutions ammoniacales.

CONCLUSION

Les quelques résultats obtenus nous permettent d'imaginer pour la matière organique des sols une structure complexe dont les méthodes physico-chimiques classiques ne révèlent qu'un aspect.

Dans un premier temps, l'usage des solutions minérales d'extraction nous a montré l'existence des liaisons organo-métalliques dans lesquelles sont engagées la plupart des combinaisons organiques.

La spectrophotométrie ultra-violette, en mettant l'accent sur ces liaisons et leur rôle dans les dosages, ne permet pas cependant d'établir une classification des différentes espèces organiques.

La chromatographie ne traumatise guère la matière organique et ne peut établir de différenciation. Seule, l'électrophorèse montre l'hétérogénéité de ces substances et arrive à pratiquer un début de séparation permettant une caractérisation partielle des groupements.

Quoiqu'il en soit, les résultats analytiques sont les mêmes qualitativement pour les deux solvants : oxalate et carbonate. On peut dire que ce sont des types de structure identique qui sont extraits. Une dégradation de l'édifice moléculaire s'impose, ce que nous avons fait dans la suite de notre travail.

TROISIEME - PARTIE

EXAMEN COMPARATIF DE LA STRUCTURE DETAILLEE DES DIFFERENTS EXTRAITS ORGANIQUES

INTRODUCTION

Les résultats précédents nous ayant permis d'avoir une idée de la structure d'ensemble de la matière organique, nous avons entrepris une étude plus approfondie dans le double but :

- d'examiner la composition chimique détaillée de la molécule organique extraite

- de permettre une comparaison qualitative et même quantitative des différents extraits de façon à pouvoir juger de la valeur des méthodes d'extraction proposées par rapport à la méthode à l'oxalate.

CHAPITRE I

EXPOSE DES METHODES UTILISEES

Afin de séparer les différentes fractions organiques ou de dissocier les complexes organo-métalliques que les solutions sont susceptibles de contenir, nous avons fait appel à deux techniques :

- l'une, utilisant les seules propriétés des résines échangeuses d'ions qui nous permettra une séparation fractionnée des diverses extractions.

- l'autre, associant l'hydrolyse à l'autoclave pendant 72 h. avec l'acide chlorhydrique 6N au passage sur colonnes.

Les méthodes d'investigation que nous avons employées sur les solutions obtenues après ces traitements préliminaires, font appel :

- à l'électrophorèse, mais comme seul moyen de contrôle, comme nous le constaterons ultérieurement.

- à la chromatographie de partage sur papier.

Dans le cadre limité de ce travail, il nous a semblé surtout intéressant de nous adresser à quelques composés de structure simple qui sont à la base de l'édifice moléculaire de la matière organique en présence c'est-à-dire :

- les acides aminés

- les glucides

- les acides minéraux et organiques

1) Méthodes préparatives

1) Opérations préliminaires

Les extraits étudiés sont ceux sur lesquels nous avons travaillé précédemment. Cependant, il se révèle nécessaire, avant le passage sur colonnes, de procéder à certaines opérations. Nous devons en particulier concentrer les solutions de départ en vue d'améliorer les résultats

et faciliter l'identification des corps ; éliminer ensuite les principes actifs des solutions : carbonate, oxalate, et ammoniaque. En effet, les élutions des colonnes se faisant avec de l'ammoniaque et du carbonate d'ammonium, il est indispensable de s'en débarasser dans les extraits initiaux avant tout traitement.

Dans les deux cas, il sera facile de chauffer dans une étuve sous vide à une température inférieure à 50°, 100 cm3 de solution, jusqu'à siccité. Cette simple opération permettra à la fois de concentrer et d'éliminer l'ammoniaque et le carbonate d'ammonium volatiles. L'extrait sec repris par quelques cm3 d'eau distillée est prêt à être passé sur colonne.

Un inconvénient majeur cependant, concernant la solution oxalatée. En effet, contrairement au carbonate et à l'ammoniaque, l'oxalate n'est guère volatil ni entraînable. Un passage de cette solution sur colonnes de résines échangeuses d'ions aura donc pour effet, étant donnée la quantité importante d'oxalate présente, de saturer rapidement la colonne acide. Aussi, cette méthode de passage directe sur colonnes n'est-elle pas appliquable à cet extrait.

2) Utilisation directe des résines

a) Principes

La technique employée fait appel à deux types de résine :
- une résine, Dowex 50, retenant les fractions basiques et dans lesquelles nous rechercherons les acides aminés
- une résine, Dowex 1, retenant les fractions acides destinées à la recherche des acides minéraux et organiques.

La solution, à la sortie de ces deux colonnes, renferme alors la fraction neutre dont une grande partie est formée de glucides.

Ces deux résines remplissent chacune une colonne de verre d'une trentaine de centimètres de long et un centimètre environ de diamètre bouchée vers le bas par une petite quantité de laine de verre.

b) Mode opératoire

Les solutions obtenues après traitement préalable passent successivement sur la Dowex 50 et sur la Dowex 1.

- la solution recueillie à la sortie de la seconde colonne est mise de coté pour l'étude ultérieure des glucides. Elle

constituera ce que nous appellerons la fraction I.

- l'élution de la colonne Dowex 50, se fait avec environ 50 cm3 d'ammoniaque 2N suivis d'un lavage ultérieur de la colonne avec autant d'eau distillée. L'ensemble de ces élutions et lavages sera appelé fraction II.

- l'élution de la Dowex I se fait simultanément avec

50 cm3 de carbonate d'ammonium
50 cm3 d'eau distillée
} la même opération répétée 2 fois

Ces éluats rassemblés constituent la fraction III

Ces 3 fractions I, II, III, sont alors individuellement de nouveau concentrées sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, dans lequel le vide est réalisé au moyen d'une trompe à eau, jusqu'à obtention de quelques cm3
Les fractions II et III sont alors réduites à siccité au bain de sable, à la plus basse température possible.

La fraction I au contraire, doit être débarassée de tout ce qui n'est pas glucide notamment peptides, protéines, etc.. Elle est soumise, dans ce but , à la défécation par de l'acétate neutre de plomb. Après filtration, l'excès des réactifs est éliminé par un courant de SH_2. Il est lui-même éliminé par un chauffage, de quelques minutes sous vide. La solution obtenue est concentrée à la plus basse température possible pour éviter une décomposition des sucres. Elle est dès lors, prête elle aussi à une étude électrophorétique et chromatographique.

3) Méthode hydrolytique

a) Principe

La deuxième technique utilisée ne diffère que dans l'utilisation d'un mode de scission supplémentaire, permettant ainsi une destruction plus totale de la molécule organique. Cette hydrolyse se fait successivement sur 100 cm3 de solution prélevée sur chacun des extraits auparavant concentrés et évaporés selon le mode opératoire indiqué plus haut et repris par 15 cm3 d'eau. Cette évaporation et cette concentration ont pour but aussi, l'élimination du carbonate et surtout de l'ammoniaque. En effet, l'hydrolyse se faisant avec de l'acide chlorydrique 6 N, cette précaution évite la formation de cristaux de chlorure d'ammonium, formation qui ne pourrait que gêner

nos recherches ultérieures en saturant les colonnes et en empêchant les identifications chromatographiques.

L'hydrolysat obtenu, doit à son tour, faire l'objet d'une précaution supplémentaire : l'élimination de la plus grande partie de l'acide chlorhydrique, agent hydrolysant. En effet, la présence d'une telle quantité d'acide chlorhydrique dans le produit aurait pour double conséquence de saturer rapidement la colonne et de gêner, sinon de rendre impossible, la révélation des autres acides présents masqués par le seul acide chlorhydrique.

Le passage sur colonne de résine après l'hydrolyse est pratiqué selon le même principe et la même technique que ceux indiqués primitivement.

b) Mode opératoire

100 cm3 de l'extrait à étudier sont concentrés sous vide jusqu'à siccité et repris par 15 cm3 d'eau. La solution obtenue est additionnée du même volume, 15 cm3, d'acide chlorhydrique 6N. Le tout est mis en ampoule scellée et portée à l'autoclave 72 h. à 120° puis, après refroidissement l'ampoule est ouverte. Le produit est formé de deux phases :
- une surnageante, jaune claire, limpide : l'hydrolysat proprement dit.
- un précipité brûnatre, insoluble et non hydrolysable en milieu acide, correspondant sans doute à une fraction de la partie humique.

L'ensemble est centrifugé ; le liquide recueilli est évaporé à cinq reprises à sec pour éliminer la presque totalité de l'acide chlorhydrique présent. La dernière reprise aqueuse doit donner une solution neutre ou proche de la neutralité.

Cette solution est ensuite passée sur colonne et traitée selon la technique préalablement décrite et donnant elle aussi, finalement, naissance aux trois fractions précitées : neutre, acide et basique.

4) Comparaison des deux méthodes

A) UTILISATION DIRECTE DES RESINES

Si l'on considère les deux techniques décrites précédemment, nous pourrons remarquer que le passage sur colonnes de résines, directement, présente les avantages suivants :

1) il permet un gain de temps appréciable

2) il met en action des moyens peu traumatisants et peut donc, en principe, permettre une séparation et des identifications nettes sans pour autant porter atteinte au produit obtenu et contenu dans les extraits.

Par contre, il apparaît que cette méthode présente certains inconvénients :

1) le passage sur colonnes est délicat. En effet nous sommes en présence d'un extrait très concentré et contenant en suspension nombre d'impuretés qui auront pour effet de colmater souvent les colonnes et d'empêcher l'écoulement. Le plus pratique est alors de mettre cette solution au contact des résines dans un flacon que l'on place dans un agitateur mécanique avant de le décanter.

2) en outre, si cette méthode permet une scission de la structure moléculaire sans dégradation de produits chimiques la composant, il est fort possible que par contre, la séparation ne soit pas assez poussée et ne nous permette pas une étude plus approfondie que ne l'ont été les études électrophorétiques par exemple.

3) enfin, et ceci constitue l'inconvénient majeur, cette méthode ne permet pas l'examen de l'extrait oxalaté, pour les raisons indiquées plus haut.

B) HYDROLYSE PREALABLE DES EXTRAITS

Dans la deuxième méthode les deux aspects du problème se retrouvent. Les avantages de l'hydrolyse acide sont les suivants :

1) par dégradation des complexes contenus dans la matière organique et l'élimination des impuretés, elle permet facilement l'usage des résines en évitant leur saturation.

2) l'hydrolyse acide constituant une attaque brutale, nous pourrons procéder à une étude plus profonde de la molécule organique.

3) enfin, surtout, en provoquant la destruction de l'oxalate, on peut étudier la solution oxalatée. Cette méthode ne comporte pas que des avantages et il nous faut signaler les inconvénients suivants :

1) possibilité de destruction des produits contenus dans les extraits, du fait du caractère brutal de l'attaque chlorhydrique.

2) méthode beaucoup plus longue que la métho-

de précédente.

En résumé, l'examen des deux techniques précitées, nous démontre l'intérêt de l'utilisation conjointe des deux méthodes. En fait, elles se complètent, la première, nous permettant un examen moins approfondi mais respectant davantage l'intégrité chimique des constituants, la seconde, nous permettant un examen plus approfondi par la révélation et l'identification de la majeure partie des produits chimiques même si nous risquons de détruire quelques-uns d'entre eux.

II - Méthodes analytiques

Nous avons eu recours à deux méthodes principales :
- l'électrophorèse comme technique d'investigation assez grossière de la fraction aminée des extracta
- la chromatographie sur papier pour une détermination plus précise des constituants.

1) Electrophorèse

Nous avons employé la technique décrite plus haut mais avec des temps de migration beaucoup plus courts :
- pH avec tampon acétique (acide acétique - pyridine - eau) 3,9
- migration de l'ordre de deux heures
- révélation avec la ninhydrine et l'isatine.

Les électrophorégrammes ont été ensuite passés au densitomètre, de façon à avoir une première idée de la richesse de l'extrait obtenu

2) Chromatographie sur papier

Nous nous bornerons à donner les caractéristiques des techniques employées, les détails ayant été décrits dans l'étude chromatographique précédente.

a) Acides aminés

Pour chaque fraction basique obtenue successivement avec les solutions, nous avons fait deux chromatogrammes découpés dans du papier ARCHES 302, en carrés de 28 cm. de côté, dans un coin desquels nous avons déposé et séché au séchoir électrique respectivement 175 et 200 microlitres de prise d'essai, le premier destiné à être révélé au réactif 1 (ninhydrine), le second au révélateur 2 (isatine), moins sensible que le précédent, ce qui

justifie la prise d'essai supérieure.

Selon la technique décrite dans la première partie, dans les cuves en verre épais, nous avons utilisé :

- pour la première dimension, le butanol acétique dont nous avons donné la composition au début.

- pour la deuxième dimension le phénol saturé d'eau.

Les temps de migration notés sont les suivants à une température moyenne de 22°.

- 9 h 30 pour le butanol acétique soit une migration correspondant à une fois 1/4 la longueur du chromatogramme

- 6 h 30 pour le phénol aqueux soit une migration correspondant à une fois la longueur du chromatogramme, la proline se trouvant, si elle existe, très proche du front du solvant.

Les chromatogrammes séchés à la température du laboratoire jusqu'à disparition totale de l'odeur du phénol, ont été ensuite révélés à la ninhydrine et à l'isatine.

Les acides aminés identifiés, nous avons ensuite opéré sur eux une évaluation comparative en appréciant optiquement l'intensité de la coloration et les dimensions de leurs taches. En fonction de cela, nous avons attribué à chacune des taches un coefficient selon la cotation que voici :

- faible proportion	+
- moyenne proportion	++
- assez forte proportion	+++
- très forte proportion	++++

Evidemment, ce procédé très approximatif ne permet pas une appréciation exacte de la teneur en amino-acides. Néanmoins, il autorise, d'une manière simple et rapide, une évaluation de l'importance de chaque acide aminé par rapport aux autres, sur le même chromatogramme. Nous pouvons ainsi dépister les amino-acides dominants, et en faire une étude comparative dans les différents extraits.

b) acides minéraux et organiques

La technique chromatographique employée s'inspire de la précédente en ce sens qu'il s'agit d'une chromatographie bidimensionnelle effectuée sur le même papier ARCHES 302 dans les cuves de même type.

Les dimensions des chromatogrammes sont différentes :

- 14 cm de longueur pour la première dimension dont le solvant sera l'alcool ammoniacal

- 14 cm de longueur pour la deuxième dimension à base de butanol formique comme solvant

Le révélateur utilisé est le réactif n° 3, employé pour la révélation des acides minéraux et organiques.

Les prises d'essai utilisées varient de 20 à 100 microlitres selon la richesse en produit de la fraction étudiée.

c) Glucides

Nous avons eu recours à la chromatographie monodimensionnelle en butanol acétique, caractérisée par une migration prolongée de 24 heures. Nous avons employé exactement la technique décrite précédemment, les révélations se faisant avec les réactifs des aldoses et des cétoses.

d) Réalisation d'un chromatogramme étalon

Pour interpréter les chromatogrammes des acides aminés et des acides minéraux et organiques, nous avons réalisé des chromatogrammes étalon à partir desquels il nous a été possible d'identifier les taches. Le même problème a été résolu différemment pour les glucides par l'utilisation de solutions témoins migrant en même temps que la solution étudiée sur le même chromatogramme.

Chromatogramme étalon d'acides aminés sur un chromatogramme découpé selon les dimensions déjà citées 28/28 cm, nous avons déposé 10 microlitres d'une solution complexe contenant un γ par millimètre cube de chacun des amino-acides suivants :
acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle, asparagine, ornithine, thréonine, glutamine, alanine, tyrosine, histidine, lysine, arginine, tryptophane, leucine, phénylalanine, proline.

Le chromatogramme a été développé, révélé, les spots fixés. Mais la coloration disparaît peu à peu. L'emploi d'un révélateur tel que celui de ZWEIGG (36)

acétate de cuivre, solution saturée	:	1 ml
acide nitrique	:	2 ml
méthanol	: q.s.p.	100 ml

ne fait que retarder l'échéance de cette disparition. De plus, nous avions fait plusieurs chromatogrammes étalon, ce qui était encombrant. Pour conserver sous la main un

moyen de référence plus maniable, nous avons porté sur une meme feuille des points figurant le centre de chacune des taches. Nous avons ainsi répéré la position moyenne de chaque amino-acide, à partir de laquelle nous pouvons ensuite figurer les taches en tenant compte, si possible, de leur forme et de leur dimension.

Nous avons enfin numéroté les acides aminés de gauche à droite et de bas en haut.

0 : point de départ
1 : acide aspartique
2 : acide glutamique
3 : serine
4 : glycocolle
5 : asparagine
6 : ornithine
7 : thréonine
8 : glutamine
9 : alanine
10 : tyrosine
11 : histidine
12 : lysine
13 : arginine
14 : valine
15 : tryptophane
16 : leucine
17 : phénylalanine
18 : proline

Résultant des nombreuses migrations que nous avons réalisées, les coefficients attribués, comme indiqué plus haut, figureront sur les chromatogrammes sous les signes conventionnels suivants :

faible proportion	+	
moyenne proportion	++	
assez forte proportion	+++	
très forte proportion	++++	

- chromatogramme étalon des acides organiques

Nous nous sommes servi d'un chromatogramme étalon, réalisé dans une publication de J. CABLES (6)

CHAPITRE II

RESULTATS EXPERIMENTAUX

AVANT HYDROLYSE

Nous appellerons :

- ox_1 : la solution oxalatée
- ox_2 : la reprise ammoniacale correspondante
- c_1 : la solution carbonatée
- c_2 : la reprise ammoniacale correspondante

Chacune de ces solutions étudiées successivement après le passage sur colonnes à résines échangeuses d'ions, a donné naissance aux trois fractions :

- neutre ou fraction 1
- basique ou fraction 2
- acide ou fraction 3

A) Etude de la fraction 1

Nous nous sommes heurtés, lors de ces recherches à différentes difficultés dont la plus sérieuse provient du faible pourcentage des glucides dans les solutions.

En outre, les solutions d'extraction employées, étant des solutions ammoniacales, on peut penser que les oses existent en partie sous forme d'osamines. Il était donc logique de rechercher ces derniers dans la fraction 2, basique, ce que nous avons aussi entrepris. Malheureusement, un obstacle encore plus difficile à surmonter nous attendait. En effet, cette fraction basique contient des acides aminés en très grand nombre, si bien que l'identification des osamines devenait impossible.

Les résultats obtenus par chromatographie sont les suivants :

a) fraction 1 de c_1

Le glucose (++) et 2 aldoses (+), non identifiés dont les Rf sont intermédiaires de ceux du raffinose et du glucose.

b) fraction 1 de c_2

Trois prises d'essai : 25, 50, 75 microlitres pour chaque chromatogramme. Par ordre d'importance : glucose, fructose, (++), mélibiose (+), et un quatrième de Rf très voisin du raffinose : X.

c) fraction 1 de ox_2

prise d'essai pour les deux premiers chromatogramme : 25, 50, 75 microlitres

révélation très vague

- prise d'essai pour les deus suivants 75, 100, 125 microlitres

nous permettent la révélation de trois sucres dont deux identifiés : le glucose et le fructose (++) et un troisième analogue au précédent x

Notons que ce sucre non identifié dans les solutions c_2 et ox_2 est le même que celui non identifié de la solution c_1 : X

B) Etude de la fraction 2

Celle-ci, nous l'avons déjà signalé, contient des amino-acides sur lesquels nous avons plus particulièrement porté notre attention. L'Electrophorèse sur papier (fig n°7 et 8) réalisé comme il l'a été indiqué précédemment, nous montre déjà au bout de trois heures de migration la présence de peptides et d'une assez grande quantité d'acidesaminés.

La chromatographie bidimensionnelle a démontré

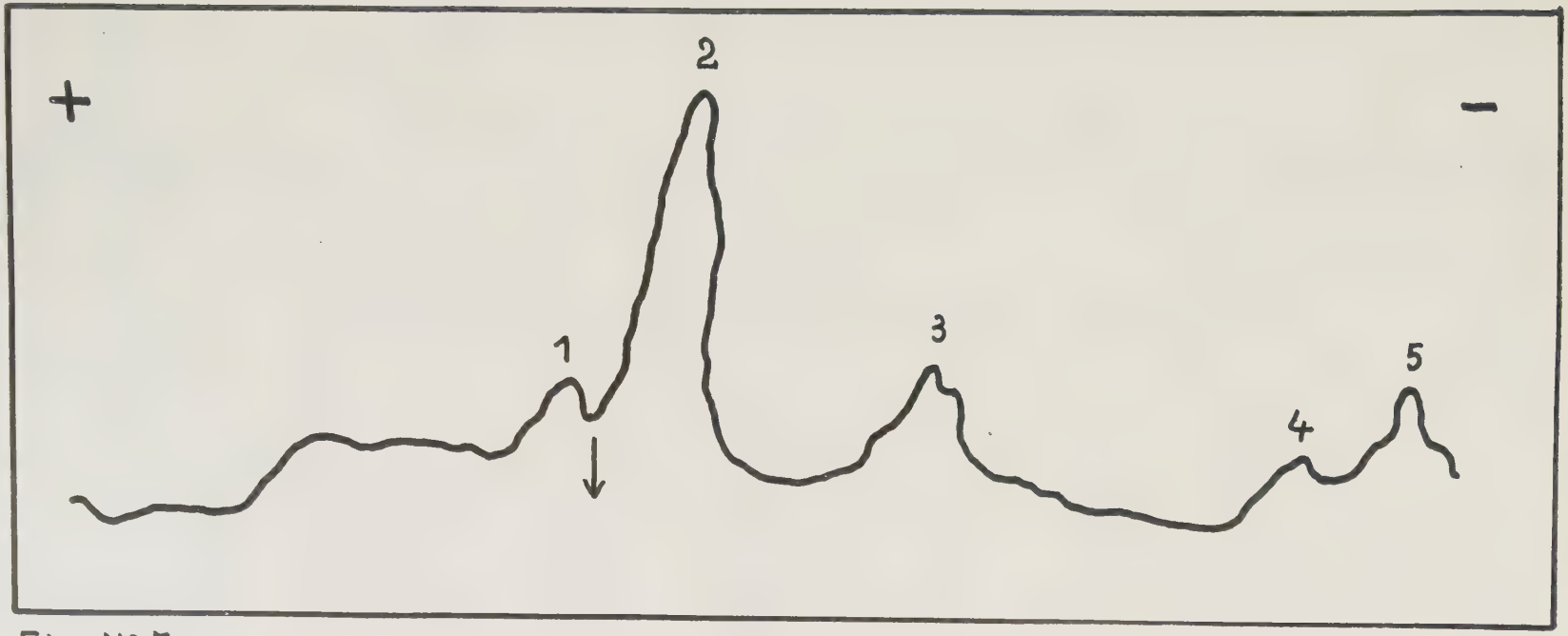


Fig. N° 7

Electrophorégramme de la reprise ammoniacale de l'extrait oxalaté après hydrolyse acide

Tampon	pH 3,9
Temps de migration	3 H

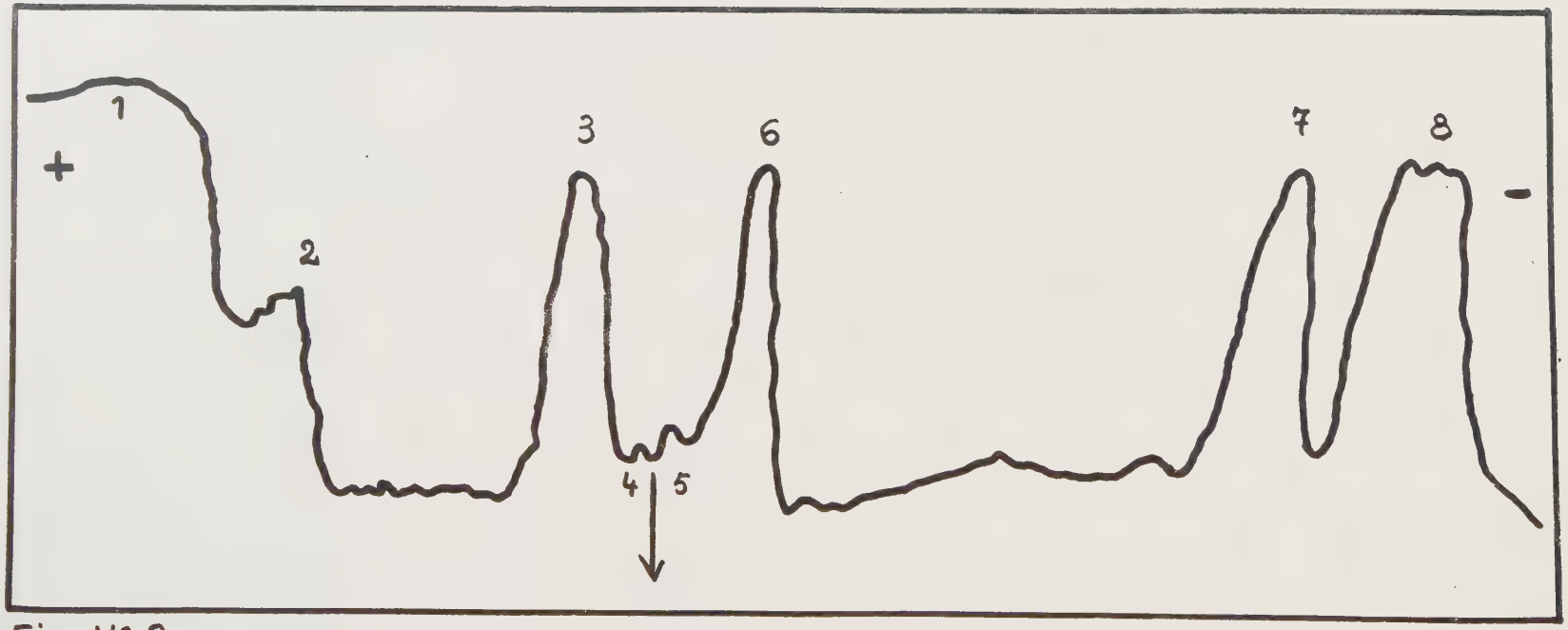


Fig. N° 8

Electrophorégramme de la reprise ammoniacale de l'extrait carbonaté, après hydrolyse acide

Tampon	pH3,9
Temps de migration	3 H

efficacement la relative richesse des solutions en acides aminés.

a) étude de la fraction 2 de c_1

La moins riche en acides aminés. 4 chromatogrammes ont été nécessaires : les deux premiers, avec respectivement 175 et 200 microlitres de prises d'essai, s'étant révélé trop flous, deux autres avec 200 et225 microlitres nous ont permis d'identification très nette de 5 acides aminés. Par ordre d'importance décroissante, ce sont :

- glycocolle (++++), acide glutamique (++), proline (++), alanine (+), leucine (+), peptides.

b) fraction 2 de c_2

Cette reprise ammoniacale s'est révélée beaucoup plus riche que l'extraction carbonatée directe.

Deux prises d'essai de 175 et 200 microlitres nous ont permis l'identification de 9 acides aminés qui sont :
le plus important glycocolle (++++), puis acide glutamique (++), proline (+), leucine (+), valine (+), thréonine (+), phénylalanine (+), lysine (-) histidine (+) et peptides.

c) fraction 2 de ox_2

Fraction la plus riche des 3 solutions. 14 acides aminés qui sont, toujours par ordre d'importance décroissante :

glycocolle (++++), acide aspartique (++), acide glutamique (++), proline (++), alanine (++), leucine (+), sérine (+)m valine (+), tyrosine(+) tyrosine (+), thréonine (+), ornithine (+), phénylalanine (+), lysine (+), histidine (+).

C) Etude de la fraction 3

Nous y avons recherché plus particulièrement les acides minéraux et organiques. Par chromatographie sur papier, nous avons pu caractériser les acides simples suivants dans chaque solution

a) fraction 3 de c_1

Quatre chromatogrammes avec successivement : 25, 40, 65, 80 microlitres de solution.

Quatre acides minéraux de concentration à peu près comparable : acide phosphorique (+++), acide sulfurique (+++), acide chlorhydrique (+++), acide nitrique (+++) ;

Quatre acides organiques : par ordre de concentration décroissante : acide citrique (++), quinique (++), succinique (+), lactique (+).

b) fraction 3 de c_2

Quatre chromatogrammes avec successivement 5, 10, 15, 30 microlitres de solution.

Quatre acides minéraux : acide chlorhydrique (+++), nitrique (+++), sulfurique (+++), phosphorique (+++).

Quatre acides organiques : acide citrique (++) le plus concentré, acide quinique (++), succinique (+), malique (+)

c) fraction 3 de ox_2

Six chromatogrammes avec 15, 30, 40, 50, 70, 80 microlitres Les mêmes acides minéraux et organiques que ceux obtenus dans la fraction c_2. Les concentrations de ces différents acides sont aussi à peu près les mêmes mais avec des prises d'essai nettement supérieures pour obtenir des résultats identiques.

II) APRES HYDROLYSE

Nous conservons, pour exprimer les résultats de chaque solution et de chaque fraction, les mêmes dénominations que pour le passage direct.

Une remarque importante : rappelons que cette méthode nous a permis l'étude supplémentaire de l'extrait oxalaté, l'acide oxalique étant détruit lors de l'attaque par l'acide chlorhydrique.

A) Etude de la fraction 1 : recherches des glucides

On retrouve dans cette fraction, les mêmes sucres que lors du simple passage sur colonnes mais en concentration beaucoup plus faible. L'hydrolyse acide n'a donc

pas eu d'effet complémentaire dans ce cas, mais a dû provoquer au contraire une décomposition des sucres. A noter que nous nous sommes heurtés aux mêmes difficultés que celles signalées lors de l'étude précédente et pour des raisons identiques.

B) Etude de la fraction 2 : acides aminés

a) fraction 2 de ox_1

13 acides aminés : ce sont, toujours par ordre d'importance décroissante :

glycocolle (++++), acide aspartique (+++), acide glutamique (+++), proline (+++), alanine (+++), leucine (++), sérine (++), valine (++), tyrosine (+), phénylalanine (+), lysine (+), arginine (+), histidine (+).

b) fraction 2 de ox_2

13 acides aminés les mêmes que ceux observés lors du passage direct sur colonnes. A noter, que si l'hydrolyse acide n'a pas permis la révélation de nouveaux acides aminés, nous trouvons cependant ces mêmes acides mais à une concentration nettement supérieure.

En effet, des chromatogrammes effectués avec des prises d'essais de 125 et 150 microlitres seulement suffisent pour une identification très nette.

c) fraction 2 de c_1

Dans ce cas précis, contrairement au précédent l'hydrolyse acide a permis l'identification de 5 nouveaux acides aminés. Nous avons donc en tout 11 acides aminés qui sont : glycocolle (++++), acide glutamique (+++), proline (+++), alanine (++) leucine (++), sérine (++), valine (++) tyrosine (+), phénylalanine (+), arginine (+), histidine (+).

d) fraction 2 de c_2

13 acides aminés : glycocolle (++++), acide aspartique (+++), glutamique (+++), proline (+++), alanine (+++), leucine (++), sérine (++), valine (++), tyrosine (+), phénylalanine (+), arginine (+), histidine (+).

Donc là encore, l'hydrolyse acide s'est révélée efficace puisque nous avons obtenu cinq nouveaux acides aminés qui sont : acide aspartique, alanine, sérine,

tyrosine, arginine alors qu'un acide aminé disparaissait : la thréonine.

C) Etude de la fraction 3 : acides minéraux et organiques

Les résultats obtenus dans cette fraction, nous montrent ici encore l'influence assez faible de l'hydrolyse. En effet, les acides organiques trouvés dans les différentes fractions sont exactement les mêmes avant et après hydrolyse, la seule modification constatée étant une diminution de la concentration des acides organiques présents après l'attaque chlorhydrique.

Quant aux acides minéraux, on note la disparition de l'acide nitrique, sans doute détruit par l'hydrolyse.

Remarquons enfin, que cette méthode hydrolytique présente un gros inconvénient : la présence d'acide chlorhydrique.

En effet, nous l'avons déjà signalé dans la technique employée, nous évaporons à cinq reprises l'hydrolysat obtenu avant de le placer sur colonnes de façon à éliminer l'acide chlorhydrique. En fait, malgré ces précautions il reste toujours une quantité appréciable de cet acide, si bien que sa présence gêne beaucoup les révélations des autres. Il nous a donc fallu l'éliminer, en découpant sur les chromatogrammes mêmes l'emplacement où il se trouvait, emplacement préalablement délimité ; récupérer les autres par élution et refaire d'autres chromatogrammes avec l'éluat recueilli et concentré. Cette élimination a été rendue relativement aisée par le fait que l'acide chlorhydrique a un Rf très faible en butanol formique, ce qui le distingue nettement des autres tels acide succinique, lactique etc... et un Rf important en alcool ammoniacal, ce qui le distingue de l'acide quinique par exemple.

a) fraction 3 de ox$_1$

Trois acides minéraux :

- acide chlorhydrique (agent d'hydrolyse) . . . . . +++
- acide phosphorique, sulfurique . . . . . ++

Quatre acides organiques :

acide citrique (++), succinique (+), quinique (+), lactique (+) ;

b) fraction 3 de ox_2

Trois acides minéraux :

- acide chlorhydrique (agent d'hydrolyse) . . . . . +++
- acide phosphorique, sulfurique . . . . . ++

Quatres acides organiques :

acide citrique (++), quinique (++), succinique (+), malique (+).

c) fraction 3 de c_1

Acides minéraux et organiques identiques à ceux de ox_1 mais à concentration inférieure nécessitant une prise d'essai de 50 microlitres au lieu de 30.

d) fraction 3 de c_2

Acides minéraux et organiques identiques à ceux révélés dans ox_2 mais à une concentration nettement supérieure : prise d'essai de 30 microlitres dans c_2 au lieu de 50 dans ox_2.

Fig. N° 9 : Chromatogramme des Glucides

1 : Raffinose

2 : X

3 : Melibiose

4 : Lactose

5 : Y

6 : Glucose

7 : Fructose

8 : Ribose

T : Solution Témoin contenant : Melibiose - Glucose-fructose

1 : Reprise ammoniacale de l'extrait au carbonate = C_2

2 : Reprise ammoniacale de l'extrait à l'oxalate = ox_2

T' : Solution témoin contenant : raffinose N lactose - glucose - fructose - rebose

3 : Extraits carbonatés et oxalatés : C_1 et OX_1

○ : +

◍ : ++

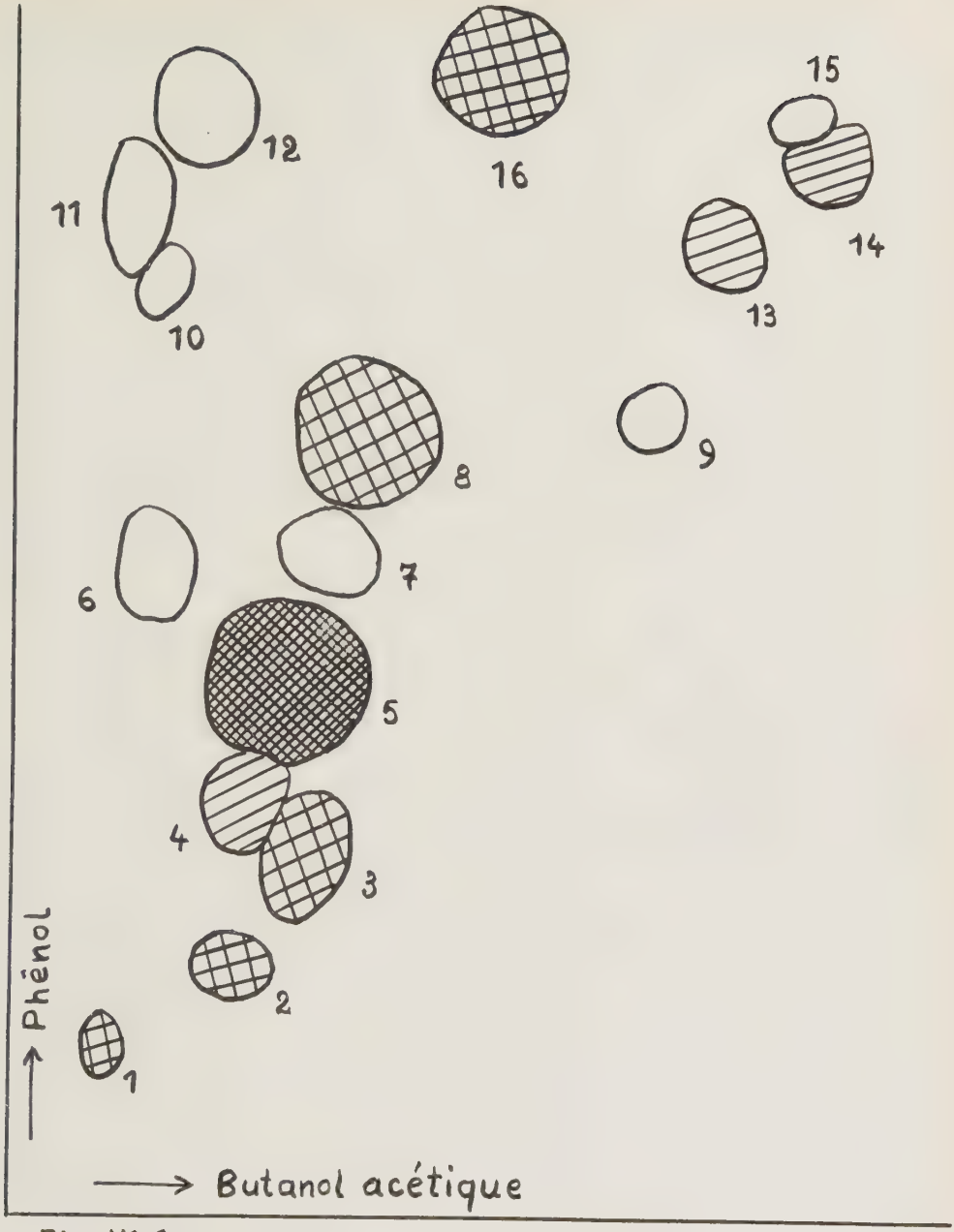


Fig. N° 9

Chromatogramme des glucides

T : témoin

1 : extrait C_2

2 : extrait Ox_2

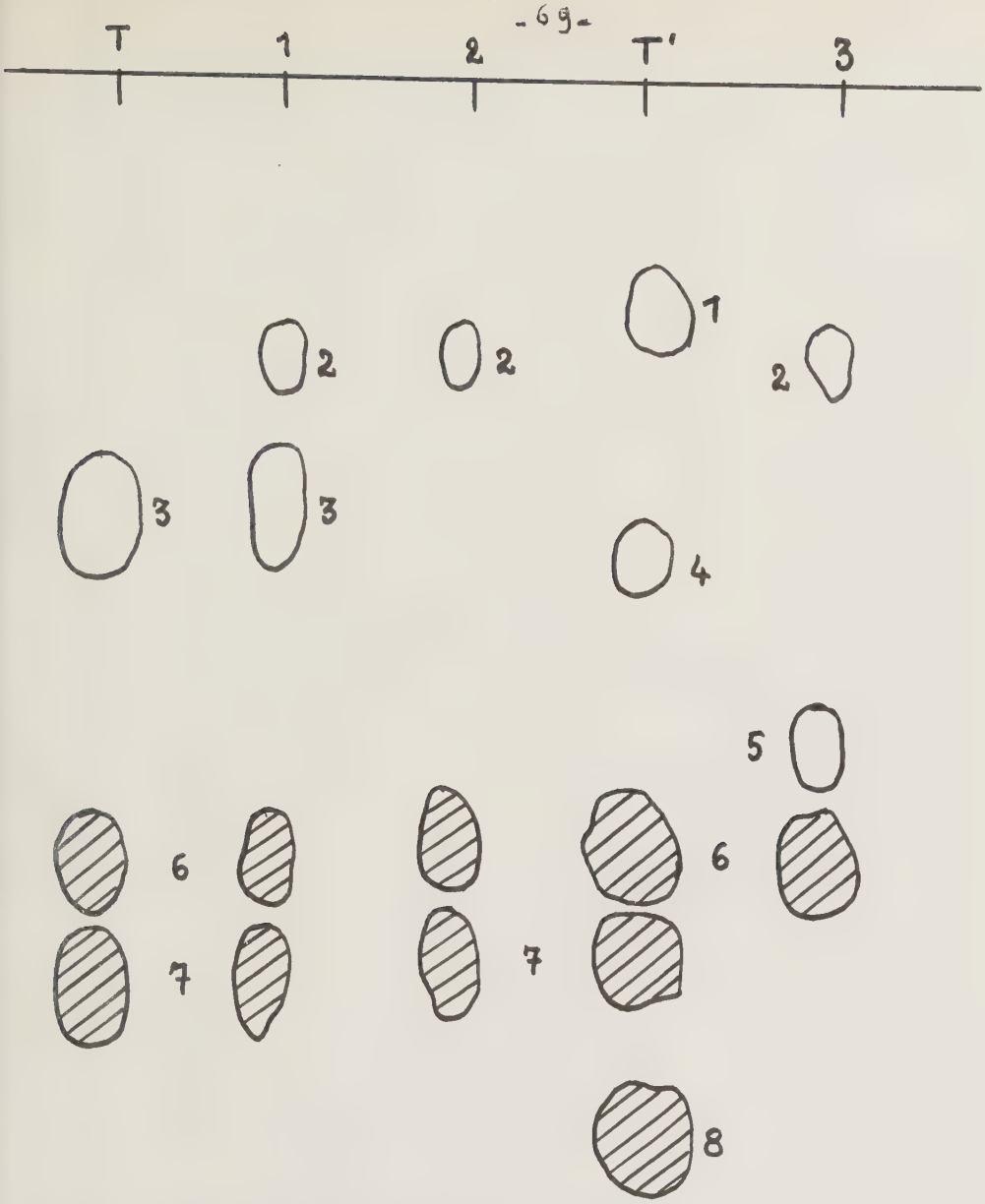
3 : extrait C_1 et Ox_1

Fig. N° 9

Fig. N°10 : Chromatogramme des Acides Aminés

1 : Peptides
2 : Acide aspartique
3 : Acide glutamique
4 : Serine
5 : Glycocolle
6 : Ornithine
7 : Thréonine
8 : Alanine
9 : Histidine
10 : Lysine
11 : Tyrosine
12 : Arginine
13 : Valine
14 : Leucine
15 : Phenylalanine
16 : Proline

: +
: ++
: +++
: ++++



Chromatogramme des glucides

T : témoin

1 : extrait C_2

2 : extrait Ox_2

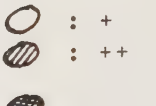
3 : extrait C_1 et Ox_1

Fig. N° 10

Fig. N° 11 :

Chromatogramme des acides minéraux et organiques

1 : Acide sulfurique
2 : Acide phosphorique
3 : Acide citrique
4 : Acide quinique
5 : Acide chlorhydrique
6 : Acide nitrique
7 : Acide malique
8 : Acide lactique



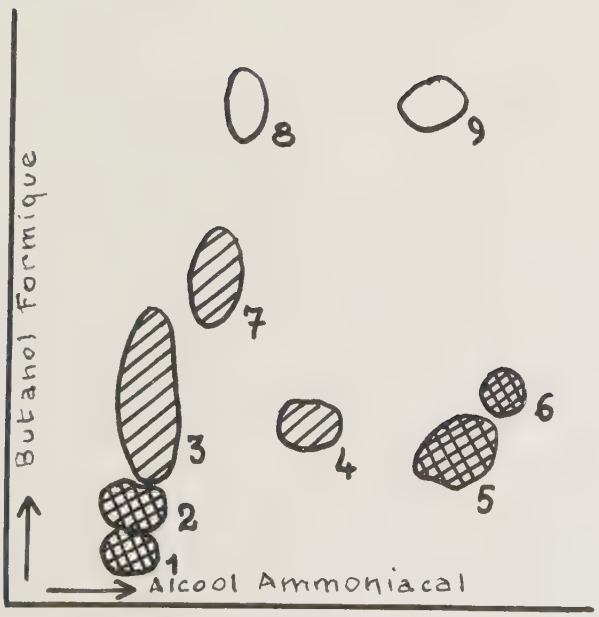


Fig. Nº 11

CHAPITRE III

INTERPRETATION DES RESULTATS

I) Avant hydrolyse

Les résultats rassemblés dans le tableau II montrent l'intérêt des reprises ammoniacales car ce sont pratiquement celles qui contiennent le plus grand nombre de composés organiques simples.

En ce qui concerne les résultats quantitatifs, nous devons remarquer que si l'on retrouve les mêmes acides, ils sont à une concentration plus forte dans l'extrait C_2 que dans l'extrait OX_2. Par contre, les acides aminés sont en plus grand nombre et en plus grande proportion dans OX_2

Enfin, il est aussi à noter que les sucres sont plus importants qualitativement et quantitativement dans C_2.

La plus grande richesse en acides aminés de la solution OX_2 est sans doute à rattacher au fait que le traitement à l'oxalate est plus énergique sur les métaux que le traitement au carbonate. Le premier temps de lessivage oxalaté étant vraisemblablement une libération plus complète de la matière organique, par formation de sels oxalate-métal, les complexes organo-métalliques plus stables sont détruits par l'oxalate alors qu'ils ne le seront pas par le carbonate.

La séparation des dérivés organiques et minéraux simples directement après passage sur colonnes de résines, pose le problème de l'existence ou de la non existence de tels composés à l'état libre dans les sols. Le fait qu'il n'ait pas été possible de les séparer directement par l'électrophorèse ou chromatographie des solutions initiales semblerait prouver qu'il n'en était rien et que c'était le passage sur colonnes qui avait libéré ces produits des combinaisons dans lesquelles ils étaient engagés. Cependant, on pouvait penser que dans ces chromatogrammes ou électrophorèses, de tels composés étaient dissimulés par les grosses molécules organiques et ne pouvaient être

	Avant hydrolyse			Après hydrolyse			
	C_1	C_2	Ox_2	Ox_1	Ox_2	C_1	C_2
GLUCIDES							
Glucose	++	++	++	++	+	++	++
Fructose		++	++		++		++
Mélibiose		+					+
Aldose X	+	+	+	+	+	+	+
" Y	+			+		+	
ACIDES AMINES							
Glycocolle	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Ac. aspartique			+++	+++	+++		+++
Ac. glutamique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Proline	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Alanine	+++		+++	+++	+++	+++	+++
Leucine	++	++	++	++	++	++	++
Sérine			++	++	++	++	++
Valine		++	++	++	++	++	++
Tyrosine				++	++	++	++
Thréonine		+	+		+		
Ornithine			+		+		
Phénylalanine		+	+	+	+	+	+
Lysine		+	+	+	+		+
Arginine				+		+	+
Histidine		+	+	+	+	+	+
ACIDES MINERAUX							
Ac. chlorhydrique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ac. sulfurique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ac. nitrique	+++	+++	+++				
Ac. phosphorique	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ACIDES ORGANIQUES							
Ac. citrique	++	++	++	++	++	++	++
Ac. quinique	++	++	++	++	++	++	++
Ac. succinique	+	+	+	+	+	+	+
Ac. malique		+	+		+		+
Ac. lactique	+			+		+	

T A B L E A U II

élués subissant en quelque sorte une simple adsorption sur la substance organique macro-moléculaire. Une expérience simple nous a éclairé sur ce sujet. En effet, nous avons ajouté aux quatre solutions d'extraction, à des concentrations différentes, une solution témoin contenant des acides aminés. Cette solution avait la composition suivante :

acide glutamique
acide aspartique
acide γamino-butyrique
alanine

Nous en avons fait des chromatogrammes, comme il en avait été fait sur les solutions elles-mêmes avant toute action. Nous avons constaté alors que le témoin interne ajouté n'était en aucune façon adsorbé sur le complexe. En effet, outre le complexe qui reste au point de départ, les 4 acides aminés de la solution ont migré normalement.

Il faut donc supposer que c'est le passage sur résines qui libère les produits, ceux-ci pouvant être engagés sous forme de combinaison organo-minérale simple : sels métalliques d'amino-acides ou sels d'acides minéraux de ces amino-acides etc..., ou bien sous forme organique simple : protéines etc...

Quelles sont d'ailleurs les propriétés des résines utilisées ?

- la résine DOWEX 50 est une échangeuse de cations, utilisée entre autres à l'adoucissement de l'eau et à la déminéralisation partielle de celle-ci. Si les acides aminés ou les acides organiques existent sous forme de sels métalliques, nul doute qu'il n'en soient libérés.

Cettemême résine est, de plus, excellente comme catalyseur pour l'hydrolyse d'esters. Si les acides organiques existent sous cette forme on peut penser que le passage sur colonnes peut les saponifier.

Il est par ailleurs bien connu que le passage d'une solution d'un sel organique à travers une colonne de DOWEX 50 sous forme H+ libère quantitativement l'acide du sel.

Enfin la DOWEX 50 réalise l'hydrolyse des protéines. La gélatine et la caséine sont rapidement hydrolysées par cette résine.

- la DOWEX 1 qui est un échangeur d'anions basiques sépare les acides et convient elle-même comme catalyseur. Cette résine n'aurait vraisemblablement dans ces "mises en liberté" qu'un rôle beaucoup plus effacé que la DOWEX 50.

Quoiqu'il en soit, il semble bien se préciser que c'est le passage sur colonnes qui libère ces composés simples.

II) Après hydrolyse

Par comparaison des divers résultats obtenus avant et après hydrolyse acide, il semblerait en fait que le traitement par colonnes cationique et anionique est analogue, quant à ses effets, à l'hydrolyse. Effectivement, seuls la concentration et le nombre des acides aminés se trouvent augmentés. Cette remarque est surtout valable pour la fraction C_1 sur laquelle l'attaque acide permet une identification de 5 nouveaux acides aminés : sérine, valine, tyrosine, arginine, phénylalanine.

Par contre, l'effet inverse est observé sur les fractions acides et neutres. En effet, non seulement l'hydrolyse chlorhydrique ne permet pas de nouvelles identifications mais encore les composés présents se trouvent-ils à des concentrations nettement inférieures.

Ces résultats confirment l'hypothèse émise précédemment sur le rôle des résines. Il semblerait en effet, que les colonnes aient une action hydrolysante douce permettant la libération des corps simples sans pour autant détruire totalement la molécule et dégrader les composés isolés.

CONCLUSION

La technique associant les colonnes échangeuses d'ions et la chromatographie sur papier, déjà utilisée par LAWSON et WARD (23) pour l'étude des acides subhumiques, nous a permis de mettre en évidence un grand nombre de composés organiques simples.

En ce qui concerne les seuls acides aminés, les 14 ou 15 amino-acides simples caractérisés dans les reprises ammoniacales dépassent de beaucoup le nombre de ceux trouvés par les auteurs précédents. (2, 32, 35). TURCHIN en particulier, ne caractérisa que 6 acides aminés dans l'hydrolyse acide de terre russe.

De tous les travaux effectués sur la même terre nous pouvons conclure :

I) que les deux méthodes : oxalatée et reprise ammoniacale - carbonatée et reprise ammoniacale correspondante sont de valeur sensiblement égale, tout au moins en ce qui concerne les composés chimiques étudiés. Nous ajouterons, que ces extractions oxalatée et carbonatée d'une part, reprise ammoniacale d'autre part, contiennent exactement les mêmes composés. L'étude électrophorétique de ces différents extraits nous procurant parallèlement les mêmes révélations, est, à ce sujet, fort instructive. Seules, les quantités extraites varient, l'extraction oxalatée se révélant plus efficace que son homologue carbonaté ; par contre, les reprises ammoniacales donnent dans l'ensemble de moins bons résultats que la reprise ammoniacale carbonatée. L'examen détaillé des différents extraits nous fait apparaître que :

a) *l'extraction oxalatée* est plus efficace en ce qui concerne les acides aminés puisque nous en obtenons un plus grand nombre et à des concentrations plus fortes. L'ordre des concentrations décroissantes, nous le rappe-

lons est le suivant :
glycocolle (++++), acide aspartique, acide glutamique, proline, alanine (+++), leucine, sérine, valine, (++), tyrosine, phénylalanine, lysine, arginine, histidine (+).

Les extractions carbonatées nous permettent la révélation et la notation selon le même principe des acides aminés suivants : glycocolle (++++); acide glutamique, proline, alanine (+++) ; leucine, sérine, valine (++) ; tyrosine, phénylalanine, arginine, histidine (+).

En fait, seules les concentrations employées sont décisives. Après ces études, nous avons la conviction qu'en partant de prises d'essai plus importantes, nous pourrions identifier d'autres acides aminés existant en quantité inférieure à ceux déjà extraits et révélés.

b) *la même conclusion est valable* pour les composés acides, minéraux et organiques. Nous obtenons des résultats identiques dans les deux méthodes d'extraction à la différence près cependant que la méthode au carbonate est supérieure dans ce cas précis à la méthode à l'oxalate.

c) enfin, au chapitre des glucides, indiquons que là encore nous obtenons les mêmes substances avec une efficacité supérieure de la méthode au carbonate, surtout dans le cas de la reprise ammoniacale.

II) La seconde conclusion qui découle de cette étude, concerne la richesse des reprises ammoniacales puisque ce sont elles qui nous permettent les plus nombreuses identifications. Or, ces reprises par l'ammoniaque 6N constituent une nouveauté. Se contenter d'une seule extraction à l'oxalate ou au carbonate pour pratiquer un dosage de la matière organique est donc illusoire.

Nous avons rassemblé tous ces résultats dans le tableau II et les différents chromatogrammes.

Nous ajouterons que nous sommes encore éloignés de la méthode d'extraction idéale, car, un simple dosage

manganimétrique de la matière organique sur l'échantillon de terre ainsi traité, prouve sans équivoque la présence encore importante de composés organiques.

Le problème est de savoir pourquoi, dès lors, de nouvelles tentatives d'extraction par nos solutions carbonatées et oxalatées ou nos solutions ammoniacales sont sans effet à ce stade sur l'échantillon ainsi traité.

L'hypothèse qui paraît s'imposer est la suivante :

la matière organique, de par sa structure, est d'une très grande complexité, comprenant des liaisons de toutes sortes. Parmi celles-ci, se trouvent certainement des liaisons ions minéraux-matière organique. Nous nous sommes déjà longuement étendus sur l'action qu'aurait l'oxalate ou le carbonate à l'encontre de ces liaisons. Par contre, il est fort possible que la matière organique libérée des ions minéraux, elle aussi de structure fort complexe, avec des liaisons inter-moléculaires et intra-moléculaires de toutes sortes, nécessite d'autres solvants que l'ammoniaque pour être totalement solubilisée et extraite. Sans doute,

après l'action décomplexante de l'oxalate et du carbonate d'ammonium

partiellement solubilisante de l'ammoniaque,

faut-il avoir recours à d'autres solvants spécifiques pour solubiliser les différents types de molécules existant dans la matière organique.

Nous pensons, quant à nous, qu'après les actions des solutions oxalatée, carbonatée et ammoniacale, l'addition de réactifs spécifiques de certains groupements chimiques définis tels que des floculants des protéines par exemple, provoqueraient une précipitation et une nouvelle extraction d'une autre parcelle de la matière organique.

Ainsi, par l'action successive des différents réactifs spécifiques, nous arriverions, peut-être, à extraire la presque totalité, sinon la totalité de la matière organique présente dans l'échantillon de terre étudié.

CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cette étude, revenons sur les résultats obtenus et sur les perspectives qu'ils autorisent.

Le premier but de notre travail était la recherche d'une méthode d'extraction de la matière organique, aussi complète que possible, et permettant une meilleure investigation.

En modifiant la méthode Chaminade par l'emploi du carbonate d'ammonium, suivi d'une reprise par l'ammoniaque, nous avons pu montrer l'efficacité de cette dernière opération.

Aussi, avons-nous pu mettre au point définitivement une méthode, qui sans être parfaite, facilite ultérieurement le travail analytique.

Une fois en possession des solutions, la seconde étape de notre travail fut un essai de recherches sur la structure globale de la matière organique, effectué sur les deux méthodes de façon à avoir une valeur comparative de chacune d'entre elles. Pour la circonstance, nous nous sommes adressés à diverses techniques modernes susceptibles de nous donner les éclaircissements espérés.

Celles-ci nous ont permis de préciser :
- l'extrême richesse en groupements peptidiques.
- la présence de groupements aminés
- la structure moins fortement liée des reprises ammoniacales.
- la parfaite identité de la matière organique dans les extractions directes d'une part (oxalaté et carbonaté) et des deux reprises ammoniacales entre elles d'autre part.

Cette extrême complexité de la structure organique nous démontre la nécessité de l'utilisation de

moyens de scission plus brutaux pour une étude plus approfondie.

Ceci fit l'objet de la troisième partie de notre étude où deux techniques principales furent employées :

1) les résines échangeuses de cations et d'anions.

2) l'hydrolise acide suivie du passage sur résines.

Nous pûmes, grâce à l'emploi de ces deux méthodes, réaliser ainsi une étude intime de la matière organique extraite dans les différentes fractions, révéler et identifier les nombreux composés chimiques, établir une valeur de chaque extrait par la comparaison des résultats obtenus. Cela nous permit, notamment, d'apprécier l'efficacité des reprises ammoniacales.

Sans doute cette étude est-elle incomplète. Nous nous sommes attachés en effet à la recherche et à l'identification des composés qui sont les plus dégradés, c'est-à-dire, à la base même de l'édifice moléculaire. Nous avons fait volontairement abstraction d'autres composés importants : bases puriques, bases pyrimidiques, osamines, phénols et dérivés phénoliques (nous pensons là à l'investigation par fusion alcaline, de la partie non hydrolysable), préférant nous limiter à l'étude plus complète des acides aminés, acides et glucides.

Enfin, les résultats obtenus ainsi que les différences observées entre les produits d'extraction par les diverses méthodes utilisées peuvent nous permettre de dégager quelques hypothèses sur la nature de la matière organique des sols.

Celle-ci peut être libre ou liée au squelette minéral : silice, argile, la forme libre n'étant le plus souvent qu'une forme intermédiaire destinée à être fixée plus ou moins vite.

La matière organique libre ou liée au squelette argileux ou siliceux se trouve le plus souvent sous forme organo métallique et il faut la libérer de ses dérivés

mixtes et de ses liaisons avec l'argile.

La première action du solvant peut être de provoquer une sorte d'élution des substances retenues sur l'argile tout comme les solutions de ces corps (carbonatées et oxalatées), sont parfois utilisées pour éluer les dérivés retenus sur les résines.

Ce dernier type de liaison laisse à supposer la présence d'agents chélatants, nombreux dans la matière organique des sols. Il y aurait là, un autre mode d'action des solutions d'extraction : les corps comme l'oxalate ou le carbonate sont des agents précipitants des métaux et pourraient rentrer en compétition avec les agents chélatants pour l'ion métal.

Le déplacement de tels équilibres est extrêmement complexe. Ces chélates fonctionnent à la manière de solutions tampons et dès qu'ils sont chargés ils peuvent devenir hautement solubles dans l'eau.

Les deux modes de liaison (organo-métallique et chélate) pourraient être rassemblés dans les sols, les chélates étant, on le sait, fortement fixés par les argiles.

Enfin, étant donné la présence de groupements ioniques, carboxyliques ou hydroxylés, on peut expliquer encore la solubilité de certaines substances organiques n'entrant pas dans ces deux catégories précédentes.

Tout ceci, n'explique cependant pas une remarque que nous avions faite, lors de nos expériences : en effet, nous l'avons dit, avant le passage sur colonnes, nous concentrons et chassons le solvant des extraits (carbonaté d'ammonium, ammoniaque) par évaporation et redisolvons le résidu desséché par un minimum d'eau. Il est curieux de constater qu'une structure si complexe, de masse moléculaire si élevée, insoluble dans les solvants organiques, se solubilise une fois le solvant chassé avec la plus grande facilité dans l'eau distillée. La présence de nombreux protides, de glucides, d'acides nous pousse à envisager pour les différents composés organiques, un type de liaison inter-moléculaire analogue à celui rencontré déjà pour les

différents glucido-protéines, lipido-protéines etc... c'est-à-dire par CENAPSES.

On comprendrait, à la suite de cette explication:

- que les composés organiques engagés dans de telles liaisons ne soient pas solubles dans les solvants spécifiques de ces types de composés.
- qu'ils résistent à l'action des diastases spécifiques émises par les micro-organismes.
- qu'il soit nécessaire de les dénaturer par des techniques, brutales parfois (hydrolyse de 72 heures par ClH 6N) pour les isoler.

Ce type de liaison par cenapses expliquerait les remarques précédentes. Il serait dès lors curieux de tracer un parallèle entre l'existence de ces liaisons par cenapses bien connus dans le monde animal et leur présence dans la matière organique des sols.

Si cette hypothèse devait se vérifier, nul doute que des progrès importants pourraient être réalisés dans le domaine de la nutrition des végétaux.

Vu le Président,

P. BOURBON

Vu : le Doyen
Pour le Doyen
L'ASSESSEUR

BLANC

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 12 Septembre 1963

Le Recteur,
Président du Conseil
de l'Université

P. DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

(1) BETREMIEUX (R) - Etude expérimentale de l'évolution du fer et du manganèse dans les sols Ann. Agr., 1951, 3, p. 193-295.

(2) BISWAS (T.D) et DAS (N.B) - Amino acids in soils growing berseem. J. Indian Soc. Soil. Sci, 1957, 5, p. 31-8.

(3) BISERTE (G) - Séparation des amino-acides des milieux biologiques complexes - Journal of chromatography, 1960, n° 3, p. 25.

(4) BROADBENT (F.E) et OTT (J.B) - Soil organic matter-metal complexes. I. Factors affecting retention of varions cations. Soil Science, 1957, 83, p. 419-27.

(5) BROADBENT (F.E) - Soil organic matter-metal complexes II. Cations exchange chromatography of copper and calcium complexes. Soil Science, 1957, 84, p. 127-131.

(6) CARLES (J), SCHNEIDER (A) et LACOSTE (Mme A.M.) - Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, n° 1, p. 221.

(7) CHAMINADE (R) - Sur une méthode de dosage de l'humus dans les sols - Ann. Agr. , 1946, 2, p. 119-132.

(8) DROZDOVA (T.V) et EMEL'YANOVA (M.P) - Intra complex compounds of Cu with humic acids (en russe) - Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R, 1960, 31, p. 651-654.

(9) DUBACH (E), MEHTA (N.C), DEUEL (H) - The extraction of humic materials from the B horizon of a podzol with ethylene diamine tetraacetic acid- Dueng. Bodenk, 1961, 95, n° 2, p. 119-123

(10) FIFE (C.U) - An evaluation of ammonium fluoride as a selective extractant for aluminium bond soil phosphate. III - Detailed studies on selected soils - Soil Science, 1962, 93, n° 2, p. 103-123.

(11) FLAIG (W), SCHOBINBER(U) et DEUEL (H) - Umwandlung von lignin in Huminsäuren bei der Verottung von Werzenstrols. Chem. Ber., 1959, 92, p. 1973

(12) FLAIG (W) et SALFIELD (J.C) - Zwischenstufen bei der bildung von huminsäuren aus Phenolen. Transactions of 7 th. international Congress of soil Science, Madison, Wisc., U.S.A, 1960, II, 648-656.

(13) HENIN (S) et BETREMIEUX (R)- Etude expérimentale de l'évolution des matières organiques dans le sol. Compt. Rend. Acad. Science, 1950, 231, p. 550-552.

(14) HILL-COTTINGHAM (D.G) - A spectrophotometer method of analysis of chelate solutions and its application to the study of iron chelates in soils and plants. Soil Science, 1957, 84, n° 1, p. 43-49.

(15) JACQUIN (F) - Contribution à l'étude des processus de formation et d'évolution de divers composés humiques - Thèse de Sciences Naturelles, 1963, Nancy.

(16) KEIZABURO KAWAGUSCHI et KAZULINE KYUMA - Complex formation between soil humus and polyvalente cations. Nippon Dojo - Hiryogaku Zasshi, 1960, n° 3, p. 591-596.

(17) KHANNA (S.S) et STEVENSON (F.J) - Metalloorganic complexes in soils. Soil Science, 1962, 93, n° 5, p. 298-306.

(18) KONONOVA (M.M) - Soil Organic Matter - Pergamon Press New-York - 1961.

(19) KONONOVA (M.M) et ALEXANDROVA (I.V) - The biochemistry of humus formation - VIe Congrès Intern. Sc. du sol, Paris, 1956 III, 22, vol. C, p. 133 137.

(20) KONONOVA (M.M) et TITOVA (N.A) - Utilisation de l'électrophorèse sur papier pour fractionner les matières organiques du sol et l'étude de complexes humo-ferriques - (en russe) - Potchvovedenie, S.S.S.R, 1961, 11, p. 81-88.

(21) KONONOVA (m.M) et ALEXANDROVA (I.V) - Soils and fertilizers - 1959, 22, p. 77.

(22) LAATSCK (W) - Dynamik of mittel opaischen mineralboden Theodor Steinkoff, Dresde et Leipzig, 1959, p. 270.

(23) LAWSON (G.J) et WARD (S.G) - Résolution des acides sub. humiques avec des résines échangeuses d'ions - Aun. Min. Belg. 1961, n° 7-8, p. 746.

(24) LEDERER (M) - An introduction to paper electrophoresis and related methods - Elsevier, Publ. Co., New-York, 1955.

(25) LEWIS (T.E) et BROADBENT (F.E) - Soils organic complexes - 3. Exchange reactions of model compounds - Soil Science, 1961, 91, n° 5, p. 341-348.

(26) LYNCH (D.L), WRIGHT (L.M), HEARNS (E.E) et COTNOIR JR. (L.J) Some factors affecting the adsorption ofcellulose compounds, pectins and hemicellulose compounds on clays mineral - Soil Science, 1957, 84, n° 2, p. 113-126.

(27) MAGNY (J) - Communication personnelle non publiée.

(28) NODA (M) et IBA (T) - Studies on humic acid by paper electrophoresis - J. Sci. Soil, Tokyo 1958, 29, p. 32-34.

(29) SCHNITZER (M), SHEARER (G.A), WRIGHT (J.R) - A study in the infrared of high molecular organic matter extracted by varions reagents fiom a podzolic B horizon. Soil Science, 1959, 87, n° 5, p. 252-257.

(30) STEELINK (C), BERRY (J.W), HO (A) et NORDBY (M.E) - Alkaline degradation products of soil humic acid - The scientific Proceeding of the Royal Dublin Society, 1960, A, vol. 1, 59-67.

(31) TAN (K.H) et VAN SCHUYLENBORGH (J) - La matière organique dans les sols tropicaux - Agr. Sci., 1961, 9, p. 174-180.

(32) TURCHIN (F.V) - Role of mineral and biological nitrogenin the agriculture of S.S.S.R (en russe) - Potchvovedenie, 1956, n° 6, p. 15-29.

(33) VLES (F) et GEX (M). U.V absorption spectra of extracts of soils.Arch. phys. biol., 1944, 17, suppl.

(34) WALDRON (A.C) et MORTENSEN (J'L) - Soil Nitrogen Complexes Soil Science, 1962, 93, n° 4, p. 286-293.

(35) YOUNG (J.L) et MORTENSEN (J.L) - Chromatography of amino compounds in soils hydrolyzate. Ohio Agr. Expt. Stat. Research, 1958, n° 61, 18 pp.

(36) ZWEIG (G) - Preservation of ninhydrin amino acid chromatograms. Ann. Chem. U.S.A, 1956, 28 n° 3, p. 428.